Série A, N° Orsay
N° d'ordre : 7.

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Denise MARCOU

Première thèse. — NOTION DE LONGÉVITÉ ET NATURE CYTOPLASMIQUE DU DÉTERMINANT DE LA SÉNESCENCE CHEZ QUELQUES CHAMPIGNONS.

Deuxième thèse. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 29 juin 1962 devant la Commission d'examen :

MM. G. MANGENOT..... *Président.*
Ph. L'HÉRITIER.....
G. RIZET..... *Examinateurs.*
P. SLONIMSKI.....

PARIS
MASSON ET C^IE, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, 120
1962

Série A, N° Orsay
N° d'ordre : 7.

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Denise MARCOU

Première thèse. — Notion de longévité et nature cytoplasmique du déterminant de la sénescence chez quelques champignons.

Deuxième thèse. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 29 juin 1962 devant la Commission d'examen :

MM. G. Mangenot..... *Président.*
Ph. L'Héritier.....
G. Rizet..... *Examinateurs.*
P. Slonimski.....

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

PARIS
MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, 120
1962

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen. . . . . M. ZAMANSKY.

PROFESSEURS

MM.		
JULIA (G.).	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
DE BROGLIE	T	Théories physiques.
PRENANT.	T	Anatomie et Histologie comparées.
GRASSÉ	T	Évolution des êtres organisés.
PRÉVOST.	T	Chimie organique.
CHAUDRON	T	Chimie appliquée.
WYART.	T	Minéralogie et Cristal.
TEISSIER.	T	Zoologie.
MANGENOT.	T	Biologie végétale (Orsay).
AUGER.	T	Physique quantique et Relativité.
MONNIER.	T	Physiologie générale.
PIVETEAU	T	Paléontologie.
ROCARD	T	Physique (E. N. S.).
CARTAN	T	Mathématiques (E. N. S.).
LAFFITTE.	T	Chimie générale.
FAVARD	T	Géométrie supérieure.
COULOMB.	T	Physique du Globe.
Mlle COUSIN	T	Biol. animale (S. P. C. N.).
CHRÉTIEN	T	Chimie générale.
DRACH.	T	Zoologie.
KASTLER.	T	Physique (E. N. S.).
EPHRUSSI	T	Génétique.
RIVIÈRE	T	Géologie générale et Sédimentologie.
GAUTHERET.	T	Biologie végétale (P. C. B.).
LUCAS (R.).	T	Recherches physiques.
THOMAS (A.)	T	Biologie cellulaire.
ARNULF	T	Optique appliquée.
MORAND	T	Physique Enseignement.
SOLEILLET	T	Physique (P. C. B.).
FORTIER.	T	Mécanique expérimentale des fluides.
DANJON	T	Astronomie.
PETIT	T	Biologie maritime.
QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique.
GALLIEN	T	Embryologie.
EICHHORN	T	Botanique.
DE CUGNAC.	T	Biol. végétale (S. P. C. N.).
Mlle CAUCHOIS	T	Chimie physique.
THEILLIER	T	Physique du Globe.
L'HÉRITIER.	T	Biologie générale (Orsay).
GRIVET.	T	Radioélectricité (Orsay).
PONCIN.	T	Mécanique générale.
DUBREIL.	T	Arithmétique et théorie des nombres.
QUELET	T	Chimie organique.
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire.
CUVILLIER	T	Micropaléontologie.
JUNG.	T	Pétrographie.
TRILLAT	T	Microscopie et diffraction électronique.
WIEMANN.	T	Chimie organique et structurale.
JACQUINOT.	T	Spectroscopie et physique céleste (Orsay).
VASSY.	T	Physique de l'atmosphère.
DESTOUCHES	T	Théories physiques.
AMIEL.	T	Chimie générale.
HOCART	T	Minéralogie et Cristallographie.

MM.		
MATHIEU (J.-P.). . . .	T	Physique (Optique).
COUTEAUX	T	Biologie animale (P. C. B.).
MAY.	T	Zoologie (Orsay).
CHOQUET.	T	Théorie des fonctions et Topologie.
FELDMANN	T	Biologie végétale marine.
GUINIER	T	Physique des solides (Orsay).
JOST.	T	Physiologie comparée.
FORTET	T	Calcul des Probabilités et Physique mathématique.
SCHWARTZ	T	Calcul différentiel et intégral.
CHOUARD.	T	Physiologie végétale.
MALAVARD	T	Aviation (Technique aéronautique).
BRELOT	T	Calcul différentiel et intégral.
NORMANT.	T	Synthèse organique générale.
BÉNARD	T	Chimie minérale.
BUVAT.	T	Botanique (E. N. S.).
DUGUÉ.	T	Statistiques mathématiques.
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie.
ULRICH.	T	Physiologie végétale.
MARÉCHAL	T	Optique théorique et appliquée.
KIRRMANN	T	Théories chimiques.
CHADEFAUD.	T	Botanique.
Mlle LE BRETON. . . .	T	Physiologie de la nutrition
SALEM.	T	Mathématiques générales.
LELONG	T	Application de l'analyse à la géométrie.
DEVILLERS.	T	Anatomie et Histologie comparées.
EHRESMANN	T	Topologie algébrique.
FRANÇON.	T	Physique (S. P. C. N.).
GLANGEAUD.	T	Géographie physique et Géologie dynamique.
GODEMENT.	T	Mathématiques (M. P. C.).
PISOT	T	Technique Mathématique de la Physique.
ROCH	T	Géologie.
SCHATZMAN.	T	Astrophysique.
TERMIER.	T	Paléontologie stratigraphique.
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales.
LENNUIER	T	Physique (M. G. P.).
RIZET	T	Génétique (Orsay).
ROUTHIER	T	Géologie appliquée.
Mme TONNELAT. . . .	T	Physique théorique.
DIXMIER.	T	Mathématiques (M. P. C.).
SOUCHAY.	T	Chimie générale.
AIGRAIN	T	Électrotechnique générale.
BRUSSET.	T	Chimie systématique.
LÉVY (M.)	T	Physique théoriques de hautes énergies (Orsay).
Mme CHAIX.	T	Chimie biologique.
Mme HUREL-PY. . . .		Biologie végétale (P. C. B.).
PIAUX.	T	Chimie (M. P. C.).
BRUN	T	Mécanique théorique des fluides.
LEDERER.	T	Chimie biologique.
Mme DUBREIL.	T	Mathématiques (Agrég.).

MM.		
Mme Lelong	T	Mathématiques (E. N. S.).
Bellair	T	Géologie (S. P. C. N.).
Cotte	T	Physique électricité.
Dubois (J.-E.)	T	Chimie organique.
Lamotte	T	Zoologie (E. N. S.).
Michel (A.)	T	Chimie minérale (Orsay).
Olmer	T	Énergétique générale.
Rouault	T	Électricité (Orsay).
Gauthier	T	Mécanique appliquée.
Barchewitz	T	Chimie physique.
Brossel	T	Physique atomique.
Buser	T	Physiologie comparée.
Camus	T	Physiologie végétale (B.M. P. V.).
Castaing	T	Physique (Orsay).
Curien	T	Minéralogie et Cristallographie.
Moyse	T	Physiologie végétale (Orsay).
Noirot	T	Évolution des êtres organisés.
Pannetier	T	Chimie générale (Orsay).
Possompes	T	Zoologie.
Pullmann	T	Chimie théorique.
Teillac	T	Physique nucléaire et Radio-activité.
Tonnelat	T	Biologie physico-chimique.
Ville	T	Économétrie.
Willemart	T	Chimie (P. C. B.).
Dode	T	Chimie (Orsay).
Freymann	T	Recherches physiques.
Guinochet	T	Biologie végétale (S. P. C. N.) (Orsay).
Rollet	T	Chimie (P. C. B.).
Mlle Josien	T	Chimie (S. P. C. N.).
Chevalley	T	Géométrie algébrique et Théorie des groupes.
Arnoult	T	Électronique (Orsay).
Chapelle	T	Physique (Orsay).
Delange	T	Mathématiques (Orsay).
Deny	T	Mathématiques générales (Orsay).
Germain	T	Mécanique théorique des fluides.
Lucas (G.)	T	Géologie.
Allard	T	Chimie physique.
Berthelot	T	Physique fondamentale des Hautes Énergies (Orsay).
Bricart	T	Météorologie et Physique de l'atmosphère.
Mme Albe-Fessard	T	Psychophysiologie.
Friedel	T	Physique des solides (Orsay).
Julia (M.)		Études des Molécules naturelles complexes.
Lender	T	Biologie animale (S. P. C. N.) (Orsay).
Magat		Physico-chimie des radio-éléments.
Mlle Quintin	T	Électrochimie.
Monod	T	Chimie du métabolisme.
Benoit	T	Physiologie animale (Orsay).
De Possel	T	Analyse numérique.
Charlot	T	Chimie analytique.
Haissinsky	T	Radiochimie.
Lemée	T	Physiologie végétale (B. M. P. V.) (Orsay).
Guérin	T	Chimie (M. P. C.) (Orsay).
Chatelet (M.)	T	Chimie (P. C. B.).

MM.		
Jean	T	Physique nucléaire (Orsay).
Mattler	T	Physique (S. P. C. N.).
Michel (L.)		Physique théorique des Hautes Énergies (Orsay).
Bergerard	T	Zoologie (Orsay).
Bertein	T	Électronique (Orsay).
Bouissières		Chimie des radioéléments (Orsay).
Mme Couture	T	Thermodynamique et Mécanique physique.
Ellenberger	T	Géologie appliquée sur le terrain.
Franc		Biologie animale (P. C. B.)
Schnell		Botanique tropicale (Orsay).
Stolkowski		Physiologie générale.
Acher		Chimie biologique (Orsay).
Baudoin		Biologie animale (P. C. B.)
Beaumont		Biologie animale (S. P. C. N.).
Blamont	T	Géophysique Ionosphère.
Bourreau		Botanique.
Curie (D.)		Physique (M. G. P.).
Durand-Delga		Géologie.
Fréon	T	Chimie organique (Orsay).
Heller	T	Physiologie végétale.
Tortrat	T	Calcul des probabilités.
Cailleux		Géologie (S. P. C. N.).
Magnan	T	Physique (S. P. C. N.).
Daudel	T	Mécanique ondulatoire appliquée à la Chimie théorique et à la Physique nucléaire.
Mlle Fourcroy		Biologie végétale (S. P. C. N.).
Mme Choquet-Bruhat	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.
Mlle Veil		Physiologie générale.
Lwoff	T	Microbiologie.
Siestrunck	T	Mécanique physique et expérimentale.
Lacombe	T	Métallurgie des métaux nucléaires.
Brochard	T	Physique (P. C. B.) (Orsay).
Cabannes	T	Mécanique générale.
Lesieur	T	Mathématiques (M. P. C.) (Orsay).
Mazet	T	Mécanique générale (Orsay).
Caire		Géographie physique et Géologie dynamique.
Comolet	T	Mécanique des fluides.
Corabœuf		Physiologie animale.
Delloue		Physique de l'exosphère.
Houillon		Biologie animale (P. C. B.)
Jullien (J.)		Chimie (P. C. B.).
Malgrange	T	Technique mathématique de la Physique.
Olivier		Anthropologie.
Nozeran	T	Botanique II (Orsay).
Blanc-Lapierre		Physique Enseignement (Orsay).
Chevaugeon	T	Botanique (Orsay).
Kahane	T	Mathématiques (Orsay).
Samuel	T	Mathématiques (E. N. S. féminine).
Kourganoff	T	Astronomie (Orsay).
Thiry	T	Mécanique céleste.

Secrétaire général . . . . . R. Poullain.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523713_0020

NOTION DE LONGÉVITÉ ET NATURE CYTOPLASMIQUE DU DÉTERMINANT DE LA SÉNESCENCE CHEZ QUELQUES CHAMPIGNONS

Par Denise MARCOU

SOMMAIRE

Introduction 655

Première partie. — Matériel et techniques 661

I. — Morphologie et cycle des espèces 661

1° Le *Podospora anserina* 661
2° L'*Ascobolus stercorarius* 663

II. — Souches utilisées 664

III. — Milieux nutritifs 665

IV. — Techniques 665

1° Conservation des souches 665
2° Multiplication végétative 665
3° Reproduction sexuelle 667
4° Isolement et germination des ascospores 668
5° Techniques de micromanipulation 668

Deuxième partie. — Étude expérimentale 669

Chapitre premier. — Les notions de sénescence et de longévité ... 669

I. — Le syndrome de sénescence 669

II. — La longévité, une caractéristique des souches 670

1° Longévité moyenne 671
2° Dispersion des longévités individuelles 673

III. — Existence d'une période d'incubation à l'origine de la sénescence et interprétation des courbes de longévité 675

IV. — Conclusion 683

Chapitre II. — Les facteurs de variation de la longévité 685

I. — Variation de la longévité en fonction de la température..... 686

II. — Variation de la longévité en fonction de l'éclairement 688

III. — Variation de la longévité en fonction du génotype..... 690

IV. — Variation de la longévité en fonction de la taille des semis utilisés pour les repiquages et de la fréquence de ceux-ci..... 694

V. — Conclusion..... 696

Chapitre III. — La localisation cytoplasmique du déterminant de la sénescence..... 699

I. — L'hérédité maternelle de la sénescence..... 700

II. — Caractère contagieux de la sénescence..... 701

III. — Conclusion..... 705

Chapitre IV. — La réversibilité de la sénescence 708

I. — La possibilité du rajeunissement global d'un thalle sénescent 709

1° Le rajeunissement consécutif à l'action de basses températures .. 710

2° Le rajeunissement consécutif à l'action d'autres inhibiteurs de croissance 714

3° Essais de rajeunissement des « ascospores sénescentes » et des thalles « sénescents de naissance » 717

4° Rajeunissement provisoire sous l'action des hautes températures. 719

5° La possibilité de rajeunissements successifs 719

II. — Analyse au niveau cellulaire des thalles sénescents et des thalles rajeunis 723

III. — Conclusion..... 726

Troisième partie. — Discussion des résultats 729

I. — Le déterminant de la sénescence..... 731

1° La localisation extra-chromosomique et les modalités de l'évolution du déterminant 731

2° L'origine et la nature possibles du déterminant 736

II. — La sénescence des Champignons, modèle possible de mécanisme cellulaire dans le déterminisme du vieillissement 741

III. — La sénescence des Champignons dans le cadre des problèmes de différenciation..... 745

Résumé..... 749

Summary..... 754

Bibliographie..... 756

INTRODUCTION

Les notions d'âge et de sénescence ont été définies chez les Animaux supérieurs. Chez ces organismes, la différenciation des cellules et la complexité de l'organisation constituent un obstacle certain à l'étude de ce phénomène dont l'origine se situe vraisemblablement au niveau cellulaire. La sénescence globale de l'individu, seule observable chez eux, résulte-t-elle d'une altération dans le fonctionnement des cellules qui ont perdu le pouvoir de se multiplier en se différenciant ou d'un ralentissement de la division des cellules de certains tissus? En d'autres termes, s'agit-il du vieillissement de certaines cellules ou du vieillissement de certains clones ?

L'étude de ce problème serait grandement facilitée si on pouvait l'aborder à l'aide d'organismes unicellulaires ou par le biais de cultures de tissus.

Chez les Levures, qui sont des Champignons Ascomycètes unicellulaires, il n'a jamais été possible de mettre en évidence une dégénérescence clonale, bien que des souches nombreuses aient été maintenues en multiplication végétative ininterrompue et très prolongée. L'étude de quelques pedigrees de *Saccharomyces cerevisiæ* (Ephrussi, 1951) n'a pas mis en évidence de limite au nombre de divisions que peut subir une même cellule. Chaque bourgeon qui se détache laisse une cicatrice et il paraît acquis qu'un deuxième bourgeon ne se forme pas au même endroit. Théoriquement, il y aurait place sur une même cellule pour 100 bourgeons (Bartholomew et Tod Mittwer, 1953), or on compte au maximum 23 cicatrices par cellule (Barton, 1950). Est-ce à dire qu'une cellule est devenue incapable de se diviser après la formation d'une vingtaine de bourgeons ?

Les clones de Diatomées présentent une diminution progressive de la taille moyenne des individus due au mécanisme particulier de leur division. Ces Algues, en effet, sont enfermées dans une enveloppe siliceuse constituée de deux valves de tailles inégales emboîtées l'une dans l'autre. A chaque mitose, chacune des deux cellules filles emporte une des valves : elle constitue le couvercle et la seconde valve, toujours plus petite, est formée *de novo*. L'une des deux cellules filles a donc une taille inférieure à celle de sa sœur et de sa mère. Cette réduction a cependant une limite : le retour à la taille maximale est assuré par la formation de cellules particulières (auxospores) qui constituent le début d'un nouveau clone.

Chez les organismes unicellulaires, la première découverte de phénomènes assimilables à la sénescence remonte aux travaux de Maupas sur les Infusoires ciliés (Maupas, 1883, 1886, 1889). Cet auteur observe une dégénérescence à la suite d'un certain nombre de divisions et émet l'idée que l'évolution d'un clone serait comparable au développement et à la sénescence des Métazoaires. Cette question, depuis Maupas, a fait l'objet de nombreux travaux, en particulier de la part de Sonneborn et de ses collaborateurs (Dippell, 1955 ; Sonneborn, 1950, 1954, 1957 ; Sonneborn et Schneller, 1955 *a*, 1955 *b*, 1955 *c* ; Sonneborn et Craig, 1956). La dégénérescence observée paraît en relation avec la présence d'un macronucleus : des anomalies se rencontrent au cours de la division de celui-ci et ce sont elles qui entraîneraient le vieillissement des clones. Ce type de noyau étant une particularité de ces organismes, il paraît difficile de rapprocher la sénescence des Infusoires ciliés de celle des organismes supérieurs.

On aurait pu penser rencontrer la meilleure situation dans les « cultures de tissus » de Métazoaires qui rappellent beaucoup des colonies d'organismes unicellulaires. Or, si on a bien noté des difficultés dans l'entretien des souches, aucun phénomène comparable à la sénescence n'a été décrit.

Devant la difficulté d'étude des organismes unicellulaires en ce qui concerne la sénescence, force est de s'adresser à des êtres plus élevés en organisation. Il convient cependant de choisir un matériel de complexité suffisamment faible pour que l'analyse du phénomène au niveau cellulaire soit encore possible. La structure filamenteuse que l'on rencontre chez certaines Algues et chez la plupart des Champignons est certainement l'une des plus simples. La culture des Champignons est en général plus aisée et les nombreux travaux (génétiques en particulier) dont ils ont été l'objet en font un matériel bien connu, d'emploi commode au laboratoire et pour lequel un grand nombre de techniques d'études ont été mises au point.

Dans un thalle de Champignon filamenteux, les filaments croissent par leur extrémité apicale qui a les mêmes propriétés que le méristème des Végétaux supérieurs. Même dans le cas où la structure n'est pas cénocytique, les articles ne sont pas totalement isolés et des échanges protoplasmiques ont lieu. Ces thalles présentent un début très net d'organisation qui se traduit par des différenciations marquées entre articles d'âges variés. Mais chacun des articles conserve généralement toutes les potentialités et, une fois isolé, il est capable de se multiplier et il peut être à l'origine d'un nouveau clone. Ces thalles présentent donc des caractéristiques qui les rapprochent des organismes supérieurs, mais qui ne constituent pas un obstacle à des études au niveau cellulaire.

Mais connaît-on, chez ces organismes, des phénomènes pouvant entrer dans le cadre de la sénescence?

En fait, on a le choix entre des manifestations variées. Depuis longtemps, dans les mycothèques, des souches sont perdues au cours des repiquages sans aucune raison apparente ; il est souvent impossible d'obtenir de nouveaux thalles à partir d'anciennes cultures cependant vivantes ; lorsque, sur milieux complets, on entretient des souches par des repiquages fréquents, on constate qu'elles perdent, d'une manière définitive, certaines de leurs propriétés, notamment leur aptitude à la reproduction sexuelle ou à la production d'éléments de propagation. Récemment, Doguet (1955) a regroupé un certain nombre de ces cas de dégénérescence dont la plupart se prêtent assez difficilement à une étude expérimentale.

La situation est différente dans le cas de « *sénescence* » décrit par Rizet chez le *Podospora anserina*. Dans les meilleures conditions, la croissance de cet Ascomycète ne se poursuit pas indéfiniment. Elle s'effectue à vitesse constante pendant un certain temps au cours duquel on n'observe aucune variation morphologique. Puis la vitesse de croissance diminue brusquement et s'annule rapidement en même temps que l'aspect des filaments se modifie profondément (Rizet, 1953 *a*). Ces symptômes interviennent au bout d'un temps variable selon les souches, de telle sorte qu'on peut parler de leur *longévité*. Cette longévité est fonction du milieu et dépend du génotype (Rizet, 1953 *b*).

Le mycélium modifié considéré comme « sénescent » ne perd pas son aptitude à la reproduction. On peut réaliser tous les croisements possibles entre thalles jeunes et thalles sénescents ; le caractère sénescent peut être transmis par voie sexuelle : il est à hérédité maternelle et ne ségrège pas d'une façon mendélienne dans les asques. Ceci suggère que les modifications correspondantes sont de nature cytoplasmique (Rizet, 1957).

A ce stade, le phénomène était intéressant à deux titres. On se trouvait peut-être en présence d'un cas de sénescence et vraisemblablement d'un exemple d'hérédité cytoplasmique. Cette conjonction offrait un début d'interprétation du phénomène de sénescence propre à orienter les recherches dans une voie nouvelle et une méthode expérimentale, celle qu'on utiliserait pour l'analyse d'un cas d'hérédité cytoplasmique.

Pour ce type d'étude, le *Podospora anserina* s'est révélé particulièrement favorable. Les croisements sont faciles par confrontation et spermatisation, la fertilité est grande et régulière et l'analyse génétique des tétrades ne pose aucun problème difficile. Les éléments mâles (microconidies) sont très pauvres en cytoplasme et on a des raisons de penser que, seul, leur noyau participe à la fécondation. De plus, l'utilisation du micromanipulateur permet, d'une part, de réaliser des anastomoses entre filaments et, d'autre part, d'obtenir de nouvelles cultures à partir d'éléments très petits, tels qu'un fragment d'hyphe ou même un article unique.

Le phénomène a été décelé chez toutes les souches « sauvage » d'origines différentes du *Podospora* cultivées au laboratoire et il a été retrouvé chez d'autres Champignons. Nous avons apporté la preuve de la nature cytoplasmique de son déterminant. Celui-ci apparaît d'une manière aléatoire à partir d'un « précurseur » qui doit exister dans toutes les cellules et il est capable de se « multiplier » et « d'infecter » les cellules voisines. Son action ne devient visible que lorsqu'il atteint un certain seuil de concentration. Si, à partir d'un thalle sénescent, on isole des articles ou des filaments individuels, quelques-uns d'entre eux n'apparaissent pas contaminés. A la suite de divers traitements, on obtient un « rajeunissement » global des thalles qui pourrait être l'équivalent du rajeunissement d'un organisme supérieur. On peut obtenir plusieurs rajeunissements successifs. Il n'est pas douteux qu'une simple distribution inégale du déterminant ne saurait rendre compte de ces phénomènes.

L'exposé de nos recherches est conduit de la façon suivante :

— *La première partie* est une présentation du matériel et des techniques utilisées.

— *La seconde partie* groupe les observations et les résultats expérimentaux. Le chapitre I est une analyse des phases successives de la croissance ; le moment d'apparition de l'état sénescent permet de définir la longévité. L'étude des variations de cette longévité sous l'action du milieu et du génotype fait l'objet du chapitre II. Le chapitre III est consacré à l'étude de la transmission du caractère sénescent. Le chapitre IV traite des phénomènes de rajeunissement, aussi bien à l'échelle de la cellule qu'à celle de l'organisme.

— La discussion faisant l'objet de *la troisième partie* porte sur la nature et l'origine du déterminant de la sénescence, situe la transmission de l'état sénescent dans le cadre des problèmes d'hérédité extra-chromosomique et présente cette modification comme un cas particulier de différenciation cellulaire.

***

Pour la réalisation de ce travail, j'ai bénéficié des possibilités techniques du Laboratoire de Génétique de la Faculté des Sciences de Paris et du Laboratoire de Génétique physiologique du C. N. R. S. dirigés par M. le Professeur Ephrussi.

De nombreux et fructueux échanges d'idées avec les chercheurs de divers laboratoires m'ont beaucoup aidée à mieux poser et à mieux comprendre les problèmes dont j'avais entrepris l'étude. Il m'est très agréable de remercier les Professeurs B. Ephrussi, Ph. L'Héritier, M. Gans, J. Chevaugeon, R. Nozeran et P. Slonimski pour l'intérêt bienveillant qu'ils ont constamment manifesté pour mes recherches. La coopération avec mes camarades de travail, Mmes J. Beisson, C. Lefort, MM. J. Bernet, K. Esser, J. Tavlitzki m'a été également très précieuse.

Ma gratitude va aussi à M. le Professeur MANGENOT, qui a bien voulu présider mon jury de thèse, et à M. le Professeur EMBERGER, qui a accepté de publier ce mémoire dans les *Annales des Sciences Naturelles*.

Je tiens à réserver une place toute particulière à M. le Professeur RIZET, qui m'a constamment guidée et qui, par ses suggestions, ses critiques amicales et ses conseils quotidiens, a grandement contribué à l'aboutissement des présentes recherches.

PREMIÈRE PARTIE

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

1° Morphologie et cycle des espèces.

De nombreuses espèces de Champignons appartenant à des groupes variés (Ascomycètes, Basidiomycètes, Siphomycètes) ont été utilisées au cours de ce travail, en particulier pour établir la généralité du phénomène de sénescence chez ces organismes. Mais deux espèces seulement ont fait l'objet d'observations étendues, l'*Ascobolus stercorarius* et surtout le *Podospora anserina*. Ce sont ces deux espèces qui seront décrites ici.

1° ***Le* Podospora anserina *Rhem.*** — Le *Podospora anserina* (= *Pleurage anserina* (Ces.) Kuntze) est un Champignon coprophile du groupe des Ascomycètes Pyrénomycètes. C'est une espèce très répandue sur les excréments d'herbivores.

L'appareil végétatif est constitué par un mycélium filamenteux qui, en vieillissant, prend une coloration brun verdâtre. Les filaments s'enfoncent peu dans les milieux de culture et croissent plus abondamment à la surface. Lorsqu'ils s'allongent, ils se ramifient beaucoup en produisant des rameaux aériens qui communiquent à la culture un aspect duveteux. Ces hyphes sont constituées de files unisériées d'articles plurinucléés. La croissance s'effectue uniquement par l'extrémité libre. L'article qui la constitue est beaucoup plus long que les autres, il est peu vacuolisé et contient un grand nombre de noyaux. A sa base, s'isolent des articles plus petits qui se vacuolisent bientôt. Les vacuoles, en grandissant, occupent peu à peu la majeure partie de l'article et, en dernier lieu, il ne subsiste plus que du cytoplasme pariétal. Ces modifications sont d'autant plus profondes que l'on s'éloigne des extrémités en croissance, ce qui confère aux régions d'âges variés une certaine originalité. Les cloisons entre articles d'un même filament demeurent longtemps incomplètes, permettant des migrations de cytoplasme et même, quoique très exceptionnellement, des migrations de noyaux. D'autre part, des contacts s'établissent très facilement entre hyphes voisines par des anastomoses latérales nombreuses, et des échanges s'effectuent également par cette voie.

Cette espèce ne forme pas d'organes de reproduction asexuelle, mais la multiplication des cultures peut être obtenue par bouturage de fragments mycéliens. Ces fragments peuvent provenir de n'importe quelle région du thalle, ils peuvent être très petits et il peut même s'agir d'articles

uniques. La reproduction sexuelle conduit à la formation de périthèces pyriformes facilement reconnaissables à la touffe de poils fixés sur le col. L'enveloppe du périthèce est membranacée et celui-ci contient un unique bouquet d'asques (Pl. I, *E*) (1). Il n'y a que deux noyaux haploïdes fonctionnels à l'origine du périthèce (Rizet et Engelmann, 1949). Le noyau mâle provient d'une microconidie très pauvre en cytoplasme (Pl. I, *B*) et le peu de cytoplasme qu'elle possède est certainement perdu au cours de

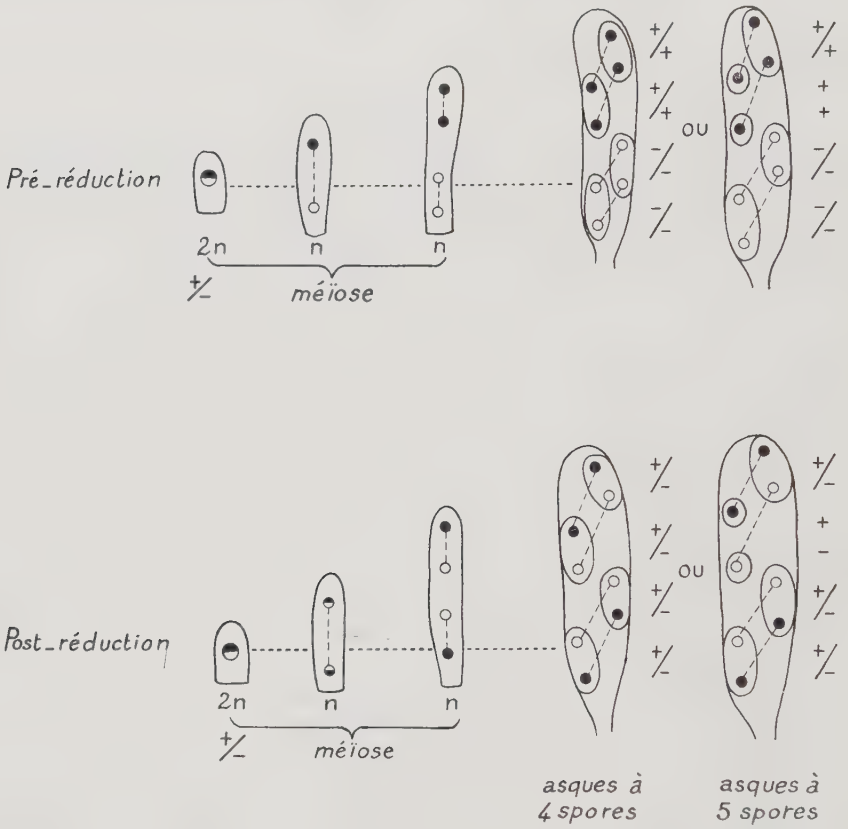


Fig. 1. — Histoire caryologique de l'asque chez le *Podospora anserina*. Ségrégation du couple de gènes d'hétérothallisme + /—.

Préréduction : les ascospores normales renferment deux noyaux de même signe ; les deux ascospores uninucléées (asques à cinq spores) sont de même signe. Postréduction : les ascospores normales renferment deux noyaux de signes contraires ; les deux ascospores uninucléées sont habituellement de signes différents. Pour ce couple de gènes, le pourcentage de postréduction est d'environ 98 p. 100.

sa migration à travers le trichogyne. Les deux éléments qui copulent sont donc très dissymétriques (Ames, 1934 ; Esser, 1959 *a*).

La caryogamie se produit dans le jeune asque. Elle est suivie immédiate-

(1) Voir Planche I page 761.

ment de la méiose. Comme chez la plupart des Ascomycètes, une mitose supplémentaire conduit à la formation de huit noyaux : chaque noyau issu de la méiose est donc produit en double exemplaire. Il se forme quatre ascospores binucléées disposées sur une seule file, mais l'histoire de l'asque est telle que chacune d'elles englobe deux noyaux non frères (fig. 1). De plus, comme on le voit sur la figure, les deux ascospores correspondant à chaque demi-asque sont génétiquement identiques.

Le *Podospora anserina* est hétérothallique : la fécondation ne peut avoir lieu qu'entre éléments mâles et femelles de signes contraires. Le signe est déterminé par un seul couple de gènes. Le chevauchement des fuseaux de la dernière division dans les asques et le pourcentage élevé de post-réduction du couple + / — conduisent à la formation d'ascospores contenant, dans plus de 98 p. 100 des cas, un noyau + et un noyau — (fig. 1). De telles ascospores binucléées donnent alors naissance à des mycéliums autofertiles. Il existe cependant un faible pourcentage d'asques pré-réduits pour le signe dont les spores conduisent à des mycéliums autostériles, de signe + ou —.

On peut obtenir des souches autostériles d'une autre manière. On trouve, en effet, de temps à autre, des asques à cinq spores (Pl. I, *F*), trois d'entre elles étant binucléées et les deux autres plus petites, uninucléées, et plus rarement des asques à six, sept et même huit ascospores. Ces ascospores uninucléées conduisent à des thalles + ou — qui présentent l'avantage d'être homocaryotiques : c'est pourquoi nous les utilisons de préférence. Chacun d'eux, qu'il soit + ou —, fournit des éléments sexuels mâles et femelles, mais ceux-ci sont incompatibles. On peut recueillir les microconidies sous forme de suspension, il est donc très facile de réaliser, chez cet organisme, les deux croisements réciproques en spermatisant des souches + par des éléments mâles — ou inversement (fig. 3) (Monnot, 1953).

2° ***L'Ascobolus stercorarius (Bull.) Schroet.*** — L'*Ascobolus stercorarius* est également une espèce coprophile très commune, mais il appartient au groupe des Ascomycètes Discomycètes.

Son mycélium blanc jaunâtre est constitué de filaments dont la structure est analogue à celle décrite chez le *Podospora anserina*. Mais, à la différence de cette espèce, l'*Ascobolus stercorarius* forme des éléments de propagation végétative ou oïdies par fragmentation de filaments mycéliens en articles libres.

Ces oïdies servent également d'éléments mâles dans la reproduction sexuelle. Les fructifications résultent de la fécondation de l'ascogone par une oïdie (Bistis, 1956). Les asques sont octosporés et les ascospores sont le plus souvent disposées irrégulièrement dans l'asque. Cette espèce est hétérothallique et le signe est déterminé par un seul couple de gènes.

2° Souches utilisées.

Nous avons isolé une seule souche de l'*Ascobolus stercorarius*, et les expériences réalisées l'ont été sur cette souche unique.

Par contre, nous avons utilisé de nombreuses souches du *Podospora anserina*. Ces souches tirent leur origine de périthèces sauvages prélevés en des régions variées. Chaque descendance, issue d'une même fructification ou de plusieurs fructifications rencontrées côte à côte dans la nature, se révèle d'emblée génétiquement homogène : dans les asques, seul le couple +/— est hétérozygote (Bernet, Esser, Marcou et Schecroun, 1960). Chacune de ces descendances constitue ainsi un ensemble de souches de même « race géographique ». Parmi les races utilisées au cours de ce travail, citons les races A, B, C, D, E, F, G, H, M, N et S. Malgré leurs phénotypes très voisins, ces races sont génétiquement très dissemblables : elles diffèrent, en particulier, par de nombreux gènes d'incompatibilité (Rizet et Esser, 1953 ; Esser, 1954, 1956, 1959 *a*, 1959 *b*). Dans les confrontations, ces incompatibilités se traduisent par des barrages (Beisson-Schecroun, 1962) ; ceci ne supprime pas la possibilité d'anastomoses entre souches de races différentes ; toutefois, si des contacts protoplasmiques s'établissent de cette manière, ils sont toujours de très courte durée.

Par ailleurs, de nombreux mutants spontanés ont été obtenus à partir de souches d'une de ces races qui, depuis longtemps, fait l'objet de travaux intéressant des sujets variés : génétique et sexualité du *Podospora anserina* (Rizet, 1941 ; Monnot, 1953), action des anesthésiques sur les asques et les spores (Rizet, 1942 *a*), rapports entre les modalités de ségrégation et l'histoire caryologique de l'asque (Rizet et Engelmann, 1949), phénomènes de barrages (Rizet, 1952 ; Rizet et Esser, 1953 ; Schecroun, 1958, 1959 ; Beisson-Schecroun, 1962), etc. Les souches mutantes et « sauvage » de cette race, utilisées dans ce travail, sont apparemment isogéniques pour tous les gènes de barrages connus ; elles portent toutes le gène S et ne manifestent pas d'incompatibilité cytoplasmique lorsqu'elles sont anastomosées entre elles. De plus, certaines d'entre elles présentent des caractères morphologiques immédiatement décelables et les gènes correspondants peuvent servir de marqueurs nucléaires. Trois de ces mutants ont joué un rôle dans le présent travail : *flexuosa* (*f*), *pumila* (*p*) et *Incolore* (*I*).

Les souches *f* se distinguent immédiatement des souches « sauvage ». Elles sont plus rases, car elles produisent peu d'hyphes aériennes et leur aspect est frisé car la croissance de leurs filaments est sinueuse au lieu d'être rectiligne. Le gène *f* est récessif dans l'hétérocaryote $F + f$.

Les spores du mutant *p* sont nettement plus petites et plus globuleuses que les spores « sauvage », ce qui les rend immédiatement décelables, aussi bien dans les fructifications génétiquement homogènes *p* que dans les fructifications hybrides *Pp*. Le gène *p* est récessif dans les ascospores hétérocaryotiques $P + p$.

Le gène *I* détermine l'absence de pigmentation du mycélium, une forte production de microconidies et une faible production d'ascogones. Les noyaux qui le portent ont un avantage sélectif très net sur les noyaux portant l'allèle sauvage *i*. Ces propriétés permettent de déceler avec certitude la migration de noyaux portant le marqueur *I*. Elles font également que toute mutation du gène *i* vers *I* devient rapidement visible. On pourra ainsi obtenir aisément, par ségrégation végétative, à partir de n'importe quelle souche *i*, un mycélium *I* qui n'en diffère que par ce seul gène.

3° *Milieux nutritifs.*

La germination des ascospores, la croissance du mycélium et les croisements s'effectuent facilement sur crottin de cheval humide stérilisé.

Toutefois, ce milieu hétérogène et opaque ne convient pas pour toutes les observations ; de nombreuses cultures et, dans certains cas, la germination des ascospores ont donc dû être réalisées sur un milieu transparent bien que solide : nous employons le moût de maïs gélosé. Il est parfois nécessaire d'utiliser un milieu de culture liquide (expériences au micromanipulateur, cultures d'articles ou de filaments isolés par broyage) : nous avons adopté le même moût de maïs non gélosé.

Pour certaines expériences, nous avons dû rechercher un milieu inhibiteur de la croissance. Le milieu synthétique sans manganèse et avec un *p*H inférieur à 6 décrit par Tavlitzki (1954) s'est révélé satisfaisant à cet égard.

4° *Techniques.*

1° ***Conservation des souches.*** — Les souches (monocaryotiques) sont conservées à l'état mycélien au froid (température de 3° C environ) sur moût de maïs gélosé. Pour les maintenir en bon état et éliminer les mutants spontanés qui pourraient se produire, nous avons recours, au moins une fois par an, à la reproduction sexuelle. Ces souches sont ainsi entretenues de génération sexuée en génération sexuée, certaines depuis plus de quinze ans, sans avoir manifesté de changement décelable.

2° ***Multiplication végétative.*** — Sur un même thalle, on peut prélever un très grand nombre de semis qui, placés dans des conditions favorables, donneront naissance à autant de cultures nouvelles. Il n'est pas toujours indifférent de prélever les semis dans n'importe quelle région du thalle ; c'est pourquoi, lorsque nous parlerons de cultures jumelles, il s'agira de cultures issues de semis de même taille, d'âges comparables, prélevés à une égale distance du centre d'une même culture.

Généralement, un semis est un carré de 3 à 4 mm de côté découpé dans

un milieu gélosé recouvert de mycélium. Fréquemment, on a besoin de semis de taille très homogène : on les obtient en les délimitant à l'aide d'un emporte-pièce avant de les prélever. Si des semis très petits sont nécessaires, nous les découpons sous la loupe binoculaire à l'aide d'une aiguille très fine. Lorsque nous devons réaliser des cultures à partir de filaments ou d'articles uniques, nous les sectionnons au micromanipulateur. Le mycélium peut également être broyé mécaniquement et les filaments ainsi dissociés et fragmentés peuvent être traités comme des organismes unicellulaires, étalés sur milieu gélosé ou dispersés en milieu liquide.

Étant donné la nature du sujet traité, nous avons été amenés à de

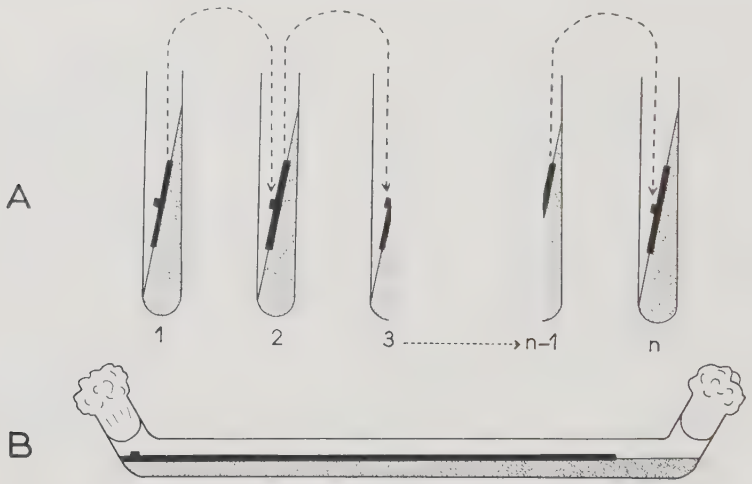


Fig. 2. — Représentation schématique des méthodes utilisées pour maintenir une lignée en croissance continue. A : par repiquages successifs ; B : en réalisant des cultures en longs tubes dans lesquels les repiquages sont pratiquement inutiles.

multiples reprises à maintenir le mycélium en croissance continue. Ceci exige que les extrémités des filaments soient constamment en présence de milieu neuf. Pour cela, nous réalisons le plus souvent des repiquages successifs à partir de semis prélevés dans la frange jeune des cultures en croissance (fig. 2 *A*). Mais, de cette manière, la continuité de croissance n'est que très imparfaitement réalisée. Aussi, lorsqu'il est nécessaire d'obtenir une meilleure continuité, nous employons de longs tubes (70 à 80 cm) ouverts aux deux extrémités dans lesquels le mycélium peut s'allonger sans aucun repiquage pendant deux à trois mois (fig. 2 *B*) (Ryan, Beadle et Tatum, 1943).

Nos cultures sont soumises le plus souvent à la température de 26° C qui s'est révélée la plus commode pour l'ensemble de nos expériences. Dans ces conditions, la croissance se traduit par un allongement de l'ordre de 7 mm par jour chez le *Podospora anserina* et de 6 mm pour l'*Ascobolus stercorarius*. Cette ambiance est obtenue le plus souvent dans des étuves

thermostatiques. Mais, quand une plus grande précision et surtout une plus grande homogénéité de la température sont nécessaires, les séries de cultures en tubes sont placées dans des bacs remplis d'eau agitée.

3° ***Reproduction sexuelle.*** — Le *Podospora* et l'*Ascobolus* fructifient l'un et l'autre sur moût de maïs gélosé, mais, en particulier lorsqu'il s'agit de cultures sénescentes, on observe une plus grande fertilité sur crottin de cheval.

La lumière est nécessaire pour la formation des organes sexuels, aussi avons-nous été conduits à éclairer les mycéliums au moment où ces organes s'ébauchent, soit après huit à dix jours de croissance.

Chez l'*Ascobolus stercorarius*, lorsque deux mycéliums de signes contraires sont confrontés, ils s'interpénètrent et les apothécies se forment sur toute la surface des cultures. Chez le *Podospora anserina*, les périthèces se forment également sur toute la surface du mycélium des souches autofertiles. Mais, lorsqu'il s'agit de confrontations de souches + et —, les périthèces ne se forment qu'à la ligne de contact des deux mycéliums (Pl. I, *C*) : cette localisation est uniquement liée au fait que les deux thalles ne s'interpénètrent pas. En réalité, toute la surface des cultures est fertilisable : on obtient, en effet, des périthèces par spermatisation en n'importe quel point d'un mycélium (fig. 3 et Pl. I, *D*). Nous réalisons de telles spermatisations chaque fois que nous désirons effectuer séparément les deux croisements réciproques. La seule difficulté de cette opération réside dans l'obtention d'une suspension de microconidies exempte de filaments mycéliens. Pour ce faire, les cultures en tubes (+ ou —) sont lavées avec du milieu liquide stérile ; on recueille de cette manière une suspension très riche en microconidies, mais qui emporte également quelques hyphes ; celles-ci sont éliminées en filtrant les suspensions sur verre fritté (Pyrex, porosité 4). Si la spermatisation est effectuée au moment où les ascogones sont réceptifs (c'est-à-dire une huitaine de jours après l'ensemencement de la culture), les fructifications se développent presque immédiatement et sont visibles à l'œil nu au bout de quarante-huit heures. Les périthèces sont mûrs deux à trois jours plus tard. La réalisation d'un croisement par confrontation ou spermatisation nécessite donc une quinzaine de jours.

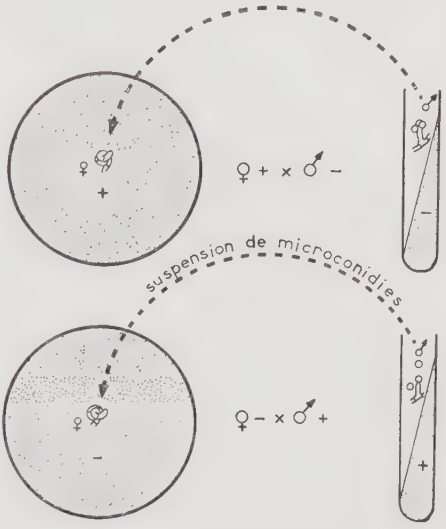


Fig. 3. — Représentation schématique des expériences de spermatisation. On apporte, sur des cultures en boîtes de Pétri utilisées comme femelles, des microconidies (éléments mâles) récoltées sur des cultures de signe contraire réalisées en tubes.

4° ***Isolement et germination des ascospores.*** — Nous avons été amenés au cours de ce travail à isoler et à semer séparément les spores de nombreux asques. Les diverses opérations nécessaires sont effectuées sous la loupe binoculaire. Elles sont facilitées par la structure du périthèce dont on peut fendre la paroi, puis extraire la totalité des asques réunis en un seul bouquet (Pl. I, *E*). Une aiguille emmanchée suffit pour étaler ces asques sur la surface d'un milieu gélosé, les ouvrir et en prélever les ascospores une à une malgré la présence d'un appendice adhésif à l'extrémité de chacune d'elles.

Les ascospores germent rapidement et en quasi-totalité sur crottin de cheval stérilisé. Mais, sur ce substrat, il est difficile de suivre les premiers stades de la germination. Ces premiers stades étant importants dans l'étude de certains aspects du phénomène de sénescence, nous avons dû recourir à une autre méthode. Une ascospore peut germer sur un milieu quelconque à condition d'être maintenue à 40° C pendant une heure et demie dans du jus de crottin stérilisé. Pratiquement, on fait subir ce prétraitement à des bouquets d'asques entiers : leur cohésion n'est pas détruite, les asques demeurent presque tous fermés, on peut donc isoler les ascospores par la technique usuelle.

5° ***Techniques de micromanipulation.*** — L'obtention de cultures à partir de filaments ou d'articles isolés ainsi que l'expérimentation au niveau de ces structures nécessitent l'usage d'un micromanipulateur. Nous avons utilisé l'appareillage de DE FONBRUNE. Les micro-instruments sont fabriqués en verre selon les techniques décrites par cet auteur (1949).

Quelle que soit l'opération projetée, elle débute toujours par le dépôt dans une microgoutte en chambre à huile d'un paquet de filaments mycéliens ; elle se poursuit par le transfert de filaments uniques dans de nouvelles microgouttes ; il s'agit ensuite soit de les amener délicatement au contact les uns des autres avec des micro-aiguilles pour favoriser les anastomoses, soit de les fragmenter en des endroits très précis à l'aide de microscalpels. Pour assurer la survie, au cours de toutes ces opérations, il est nécessaire d'éviter les pertes de protoplasme par les extrémités sectionnées. Pour cela, nous exerçons préalablement une pression modérée au point choisi : elle déclenche presque instantanément le mécanisme d'obturation des pores des cloisons voisines.

Toutes ces techniques de micromanipulation s'appliquent à l'étude de la sénescence au niveau cellulaire. Sur ce phénomène, la température joue un rôle déterminant : nous avons donc été amenés pour un certain nombre d'expériences à réunir l'ensemble des appareils dans une cage à parois transparentes maintenue à température constante.

Les techniques décrites ici sont les plus usuelles. La description des techniques plus particulières sera faite à l'occasion de la présentation des expériences correspondantes.

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE PREMIER

LES NOTIONS DE SÉNESCENCE ET DE LONGÉVITÉ

Lorsqu'un semis est prélevé dans une culture du *Podospora anserina*, la majeure partie de ses filaments reste vivante et peut donner naissance à un nouveau thalle. La reprise du semis, même dans les conditions les plus favorables, n'est pas immédiate et la croissance nouvelle n'est décelable que plusieurs heures plus tard. Cette croissance se traduit à la fois par un allongement de la partie apicale des filaments et par une ramification de ces derniers. Les nouveaux rameaux peuvent naître aux dépens de n'importe quel article. Ces caractéristiques font qu'à chaque instant une partie seulement d'entre eux parvient à s'allonger et à se ramifier dans l'espace limité que constitue la surface d'un milieu solide. Cette concurrence joue de telle façon que la densité du mycélium paraît constante sur toute la surface de la culture. On peut mesurer la vitesse de la croissance en notant, jour après jour, l'accroissement de surface du thalle ou, ce qui est plus simple, l'augmentation de longueur du rayon des cultures. On constate qu'elle est strictement proportionnelle au temps (7 mm par jour sur moût de maïs gélosé à 26° C). Cette proportionnalité est encore plus apparente si les cultures sont faites en longs tubes où les repiquages, et par conséquent les phases d'arrêt consécutives, sont considérablement espacés, sinon supprimés.

1° Le syndrome de sénescence.

On a longtemps pensé, sur la base de telles observations, que la croissance pourrait être maintenue indéfiniment si les conditions de culture étaient constamment favorables. En fait, cette idée reposait sur des bases fragiles car, à notre connaissance, aucune expérience prolongée n'avait été faite pour la vérifier. Il était nécessaire pour cela de maintenir un mycélium en croissance continue. Lorsqu'un tel essai a été tenté, et ceci d'ailleurs dans un autre but (Rizet, 1952), il a conduit à un échec. La croissance du mycélium ne se poursuit pas indéfiniment ; après un parcours à vitesse constante, cette vitesse diminue puis, un jour ou deux plus tard,

le mycélium cesse de croître (Pl. II, *A* et *B*) (1). L'observation du mycélium formé au cours de la dernière période révèle que les hyphes sont plus grêles, plus sinueuses, moins denses ; leurs extrémités se vacuolisent (Pl. II, *E*) ou se gonflent (Pl. II, *F* et *G*), la paroi de certaines d'entre elles éclate et elles se vident alors de leur protoplasme (Pl. II, *H*). Au cours de cette phase, le nombre des hyphes qui poursuivent leur croissance devient de plus en plus faible, ce qui conduit à des vagues mycéliennes successives de moins en moins denses et dont la formation est de plus en plus lente (Pl. II, *A*). Fréquemment, ce type aberrant de croissance et cette morphologie anormale s'accompagnent d'une accentuation très nette de la pigmentation. L'ensemble de ces symptômes constitue le syndrome de ce que nous appelons la sénescence.

Nous avons refait les observations précédentes à de multiples reprises. Elles ont concerné des souches d'origines et de génotypes variés et nous avons observé chaque fois les mêmes processus. Les mêmes faits ont été décrits chez d'autres Champignons, tels que le *Podospora setosa* (Rizet, 1953 *a*) ; nous les avons retrouvés chez l'*Ascobolus stercorarius*, chez un Coprin et même chez des Saprolégniales. A la suite de ces premières observations, des phénomènes analogues ont été décrits chez des espèces variées. Chez l'*Aspergillus glaucus*, Sharpe (1958) a décrit sous le nom de « suicide » un arrêt de croissance inéluctable, apparaissant le plus souvent sous forme de secteurs, et très voisin par ses symptômes de la sénescence du *Podospora anserina* ; Jinks (1959) a retrouvé les mêmes phénomènes avec d'autres souches d'*Aspergillus* et l'a désigné sous le terme de « vegetative death » ; les observations faites par Lindberg (1959) sur l'*Helminthosporium victoriæ* et une partie des « saltations » rapportées par Hawker (1950) relèvent probablement du même domaine ; Chevaugeon, qui a étudié avec Digbeu (1960) la sénescence du *Pestalozzia annulata*, en a rencontré de nombreux autres exemples chez les Champignons (résultats non publiés).

Il apparaît ainsi que non seulement la totalité des souches du *Podospora anserina* qui ont été étudiées ne peuvent pas poursuivre indéfiniment leur croissance, mais qu'il en est de même pour d'autres espèces. Il y a tout lieu de croire qu'il s'agit d'un phénomène très répandu et peut-être même général.

2° La longévité, une caractéristique des souches chez le Podospora anserina.

Le temps de croissance à vitesse constante qui précède l'apparition de la sénescence est variable selon les souches. Si l'on étudie plusieurs cultures

(1) Voir Planche II, page 763.

issues d'un même thalle, on note également des différences qui peuvent être importantes. Cette dispersion est cependant limitée et elle dépend de la souche utilisée. Pour certaines souches « sauvage » de notre collection (telles que celles issues des races A et F), l'arrêt se produit très tôt (quelquefois moins d'une semaine après la germination de l'ascospore) et la dispersion observée est alors très faible. A l'opposé, ce n'est qu'après plusieurs mois et même plusieurs années que l'arrêt de croissance a pu être décelé dans les cultures du mutant I ; dans ce cas, les lignées parallèles deviennent sénescentes au bout de temps extrêmement variables : la dispersion est énorme. Les souches du premier type donnent l'impression d'un état pathologique qui se transmet au cours de la reproduction sexuelle et qui s'aggrave rapidement au cours de la croissance ; chez les souches du deuxième type, la sénescence se présente comme un accident et son caractère inéluctable n'est pas évident.

Pour analyser ces variations, nous avons choisi la souche S 18 chez laquelle la sénescence apparaît après un ou deux mois de croissance continue. Les temps de croissance des cultures parallèles de cette souche sont assez différents pour qu'une analyse de leur dispersion soit aisée et assez courts pour que l'expérience soit techniquement réalisable. Cette analyse a porté sur 300 cultures parallèles. Pour réduire au minimum les causes de variations incontrôlables, les semis originels ont été prélevés de même taille, sur le même disque mycélien issu de la germination d'une ascospore unique, dès qu'il a présenté une taille suffisante pour permettre un aussi grand nombre de prélèvements. Ces semis ont été pris uniquement sur le pourtour de la culture, à égale distance du centre, au niveau des extrémités en croissance. On pouvait ainsi supposer qu'ils étaient constitués de filaments dans le même état physiologique et de même âge. Ils ont été déposés dans des tubes de milieu nutritif gélosé aussi identiques que possible, disposés côte à côte dans la même étuve. Les cultures parallèles ainsi obtenues ont été repiquées uniformément tous les quatre jours à partir de semis prélevés dans leur front de croissance. Malgré toutes ces précautions, la sénescence est apparue après des temps très différents selon les cultures.

1° ***Longévité moyenne.*** — La même expérience a été répétée dans les mêmes conditions à partir de la même souche monospore maintenue au repos par le froid. Les mêmes résultats ont été obtenus et on a noté, en particulier, la même dispersion dans l'apparition de la sénescence. Cela revient à dire que, dans les conditions où ces expériences ont été réalisées, le temps moyen de croissance des lignées parallèles de la souche S 18 est constant. Il correspond à ce que l'on peut appeler la « longévité moyenne » de cette souche.

Est-ce à dire que l'on peut définir pour chaque souche ou même pour chaque race une longévité moyenne caractéristique ? Pour nous en assurer, nous avons utilisé une souche monospore « sauvage » A et une souche mono-

spore « sauvage » G. Pour chacune d'elles, nous avons pu déterminer la constance de la « longévité moyenne ». Les longévités moyennes de ces deux souches et celle de la souche S 18 primitivement utilisée sont très différentes les unes des autres. Nous avons ensuite recueilli une cinquantaine de spores uninucléées dans une descendance de chacune des races A, B, C, D, E, F, G, H, N et S. Chacune de ces spores a donné naissance à un thalle qui a été maintenu en croissance continue par repiquages successifs jusqu'à l'apparition de la sénescence. Chaque groupe d'une cinquantaine de mycéliums correspondant à chacun des types « sauvage » a montré une dispersion relativement faible de la longévité. Pour les souches A, G et S, chez lesquelles la comparaison a été faite avec précision, la dispersion et la longévité moyenne sont du même ordre de grandeur que celles obtenues à partir de lignées parallèles d'une souche homocaryotique. On trouvera, dans la figure 5, représentées par des courbes, les dispersions correspondant aux souches A, B, N et E.

Pour chaque race, on peut retenir la notion de longévité moyenne. Les longévités moyennes obtenues sont très différentes les unes des autres, comme l'indique le tableau I où le temps moyen de croissance va de 9 jours pour la race F à 106 jours pour la race E.

Tableau I. — Longévités moyennes mesurées par le temps de croissance de diverses souches « sauvage » d'origines différentes (à 26° C sur moût de maïs gélosé).

Race.	A	B	C	D	E	F	G	H	N	S
Longévité moyenne (en jours).	10	27	15	32	106	9	60	26	33	43

L'ensemble de ces faits s'accorde avec l'idée que, dans des conditions données, la longévité est une caractéristique qui se maintient au cours de la reproduction aussi fidèlement que les autres caractéristiques héréditaires. Dans un certain nombre de cas, d'ailleurs, nous avons testé la longévité au cours de plusieurs générations. Dans le cas de la race S entretenue pendant vingt générations successives, les longévités moyennes à 26° C, mesurées par l'allongement moyen des cultures à la première, à la troisième, à la dixième et à la vingtième génération, étaient respectivement de 20 cm, 19 cm, 21 cm et 19 cm.

Des expériences aussi étendues n'ont pas été faites pour les autres types de souches, mais tous les résultats sont concordants : pour une race donnée, la longévité moyenne des individus d'une génération ne diffère pas statistiquement de la longévité moyenne des individus de la génération précédente.

2° ***Dispersion des longévités individuelles.*** — Si la notion de longévité moyenne a un sens profond, il doit en être de même de la dispersion dont il serait intéressant de connaître le déterminisme. Nous avons déjà décrit des souches à grande longévité et à large dispersion (souches S portant le gène *I*) ; nous avons décrit également des souches à longévité très courte et à dispersion très faible (souches A). Ce type de corrélation est-il général et répond-il à une loi simple ?

Pour répondre à ces questions, nous avons étudié un certain nombre de souches en mesurant pour chacune d'elles les longévités individuelles d'un très grand nombre de cultures parallèles (le plus souvent 300) et en essayant de traduire les données acquises par des courbes. En utilisant comme paramètre, d'une part, le temps (mesuré par le nombre de repiquages effectués ou par l'allongement du mycélium) et, d'autre part, le pourcentage de lignées survivantes après chacun des repiquages, on a constaté rapidement que les courbes présentaient toutes la même forme générale. Elles comprennent un segment de droite parallèle à l'axe des temps et se poursuivent par une partie apparemment exponentielle (fig. 4 *a*). En transposant le pourcentage des survivants en coordonnée logarithmique, on pouvait donc s'attendre à ce que la partie supposée exponentielle de la courbe se traduise par une droite. C'est effectivement ce qu'on a trouvé, comme le schématise la figure 4 *b* relative à une souche S, les cultures étant faites sur moût de maïs gélosé à 28° C et les repiquages effectués tous les quatre jours. Sur cette figure,

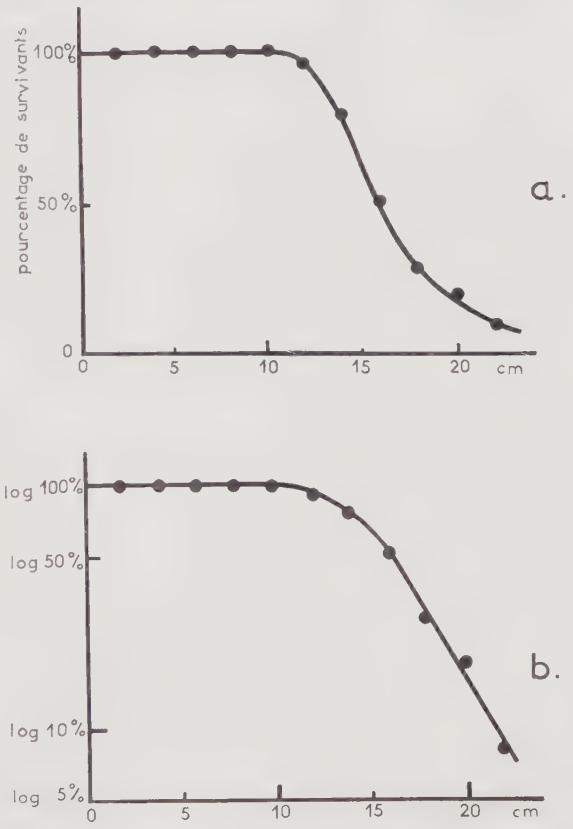


Fig. 4. — Courbes de longévité de la souche S 17 construites en utilisant 300 lignées jumelles. On a porté en abscisse l'allongement des mycéliums mesuré en centimètres et en ordonnée soit le pourcentage des survivants (*a*), soit le logarithme de ce pourcentage (*b*).

l'existence du palier traduit le fait qu'aucune des lignées ne manifeste de sénescence au début de la croissance ; sa longueur mesure la plus courte longévité individuelle observée ; quant à la dispersion, elle se mesure très simplement par la pente de la droite obtenue.

Les diverses souches « sauvage » étudiées de la même manière conduisent à des courbes qui présentent la même forme que celle établie pour la souche S 17. Nous avons groupé dans la figure 5 les quatre courbes correspondant à des souches A, B, N et E de longévité moyenne croissante (voir tableau I).

La figure 5 et le tableau I ont été établis sur les mêmes données. Ils correspondent à des expériences réalisées dans des conditions homogènes. Leur comparaison montre que, pour un type de souches donné, la longueur du

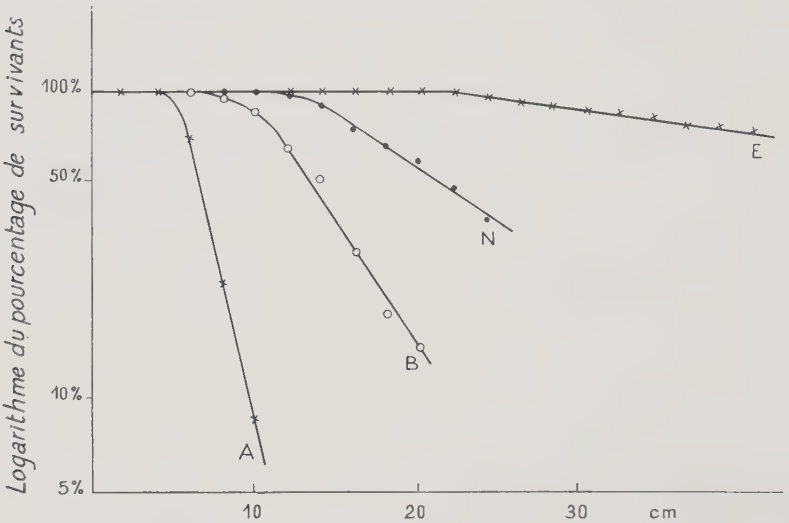


Fig. 5. — Courbes de longévité de souches des « races géographiques » A, B, N et E de longévités moyennes croissantes. (On a porté en ordonnée, comme dans toutes les courbes qui seront données par la suite, le logarithme du pourcentage de survivants.)

palier et la pente de la droite varient simultanément avec la longévité moyenne des souches : la pente est d'autant plus faible que le palier est plus long. Ces relations demeurent vraies chez toutes les autres souches « sauvage » (B, C, D, F, G, H et S) qui, pour des raisons de clarté, n'ont pas été mentionnées dans la figure 5.

De telles relations paraissent impliquer que la dispersion, tout comme la longévité moyenne, doit être héréditaire. Plusieurs vérifications de cette conclusion ont été faites. La plus étendue concerne la race S, cultivée sans interruption au cours de 20 générations sexuelles successives (voir p. 672) et pour laquelle nous avons construit des courbes de longévité correspondant à la première, la troisième, la dixième et la vingtième génération. Ces

courbes établies, non sur des lignées parallèles d'un même mycélium originel homocaryotique, mais sur des thalles issus d'ascospores uninucléées prélevées dans un même croisement, sont groupées dans la figure 6. Elles sont presque superposables et, si l'on tient compte de la difficulté de réaliser à des périodes différentes des conditions strictement identiques, il est clair qu'elles ne diffèrent pas significativement.

En résumé, la dispersion dans l'apparition de la sénescence, tout comme la longévité, est un caractère spécifique des souches ; elle est héréditaire et

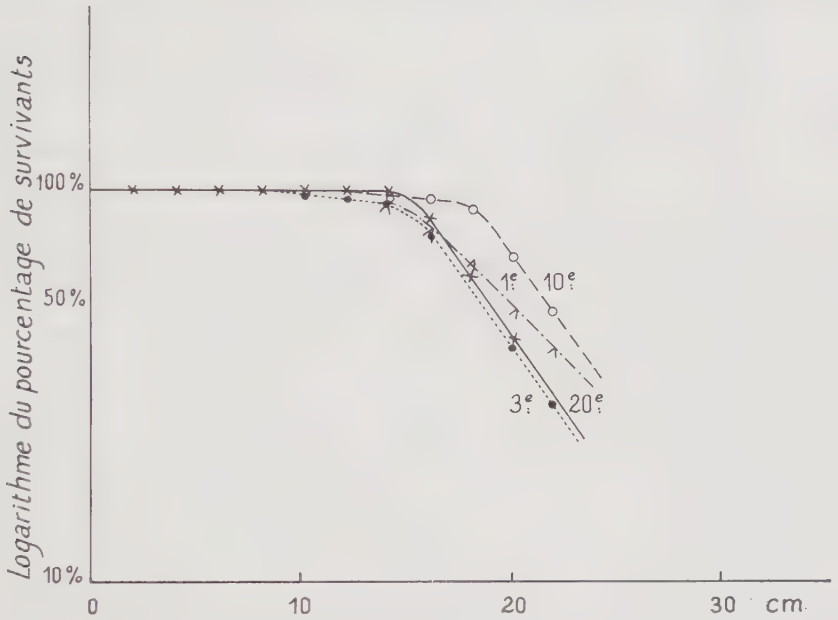


Fig. 6. — Résultats concernant la longévité des générations successives de la race S : courbes de longévité établies à 28° C se rapportant à la première, à la troisième, à la dixième et à la vingtième génération.

mesurable. Dans le système semi-logarithmique utilisé pour l'établissement des courbes, elle se traduit par une droite de pente donnée.

3° Existence d'une période d'incubation à l'origine de la sénescence et interprétation des courbes de longévité.

L'existence des corrélations que nous venons de mentionner et la forme des courbes obtenues devraient pouvoir nous apporter des indications pour la compréhension du déterminisme de la sénescence. Les droites de pente donnée qui font suite au palier ne se comprennent guère que si, dans une culture, l'apparition de la sénescence résulte de phénomènes aléatoires.

Mais quelle peut être la signification du palier qui, dans tous les cas, précède ces droites ? Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées. La forme générale des courbes évoque un phénomène nécessitant, pour se manifester, l'intervention de plusieurs événements indépendants et successifs (courbes à plusieurs coups). Mais l'hypothèse d'un seul événement ne doit pas être exclue *a priori*. Sous sa forme la plus simple, cette dernière hypothèse reviendrait à admettre qu'au début de la croissance cet événement ne peut pas se produire. Comme on voit mal à quel phénomène biologique pourrait correspondre cette inhibition, nous éliminerons, au moins provisoirement, cette hypothèse. Il serait plus plausible d'admettre qu'il s'agit d'un événement à manifestation différée : cela reviendrait à supposer l'existence d'une véritable période d'incubation avant la manifestation de la sénescence. Notons enfin que l'idée de la nécessité de plusieurs événements successifs dans le déterminisme du phénomène n'exclut pas forcément l'existence d'une telle période d'incubation. Comment choisir entre ces hypothèses ?

Plusieurs faits nous ont assez rapidement convaincus de l'existence d'une période d'incubation. A de multiples reprises, immédiatement après l'apparition de la sénescence, nous avons prélevé des semis en arrière et près de la zone de croissance anormale (jusqu'à 5 ou 6 cm). Les thalles obtenus à partir de ces semis se montrent tous très rapidement sénescents. Les semis prélevés très près de la zone aberrante ou ne montrent aucune croissance, ou conduisent à des hyphes immédiatement anormales ; les semis prélevés un peu plus haut conduisent à des mycéliums dont le début de croissance est normal, mais qui, très rapidement, acquièrent toutes les caractéristiques de la sénescence. La durée de la croissance normale est d'autant plus longue que les semis ont été prélevés plus loin du front sénescent. En d'autres termes, ces semis conduisent à la sénescence au bout de temps variables, mais ces temps sont toujours très courts, ce qui paraît impliquer que le déterminant de la sénescence était présent dans chacun d'eux. Le fait que tous les semis prélevés dans cette région emportent cette potentialité ne saurait avoir comme cause, ou du moins comme cause unique, une infection provenant de la zone anormale et se propageant le long des filaments en sens inverse de celui de la croissance. En effet, cela n'expliquerait pas que certains de ces semis montrent un début de croissance normale. Chacune des cultures ainsi obtenues devient sénescente, soit immédiatement, soit au bout d'une période très courte mais « finie », ce qui semble indiquer qu'aucun phénomène aléatoire nouveau ne paraît jouer dans leur évolution. Ainsi, avant que la sénescence ne se manifeste, le mycélium d'apparence normale le plus tardivement formé est déjà atteint. Le terme de l'évolution de cet état pathologique, c'est-à-dire la sénescence visible, est déjà prédéterminé, l'issue se produisant au bout d'un temps prévisible.

On a réalisé d'autres expériences dans lesquelles on a éliminé la possibilité d'une contagion. Leur schéma est le suivant : on part d'un thalle

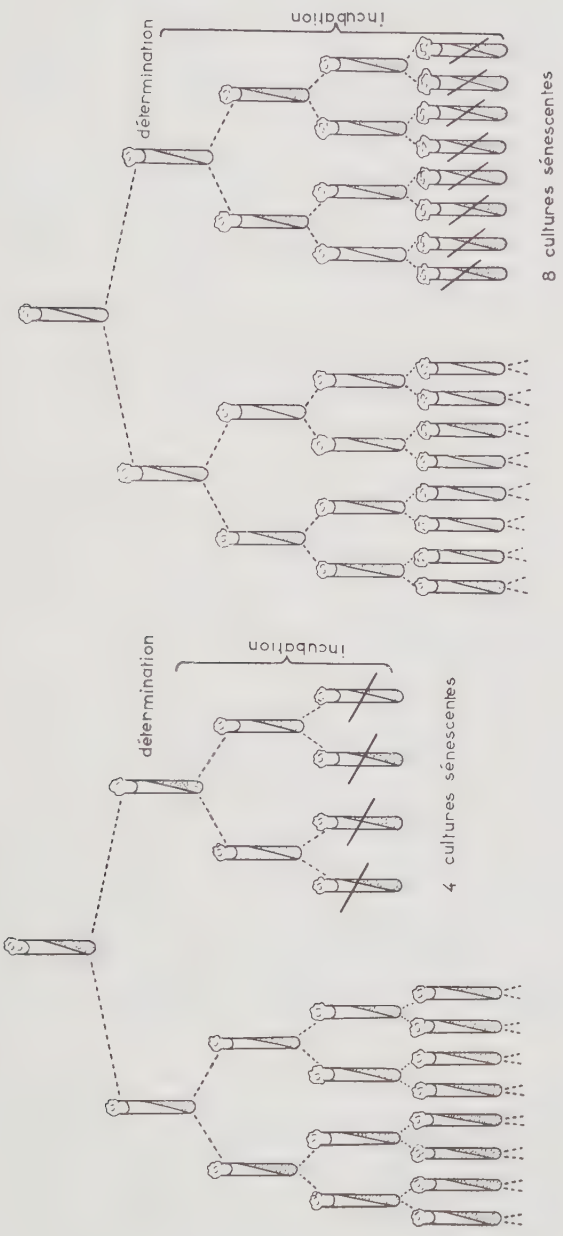


Fig. 7. — Schéma montrant le groupement des cultures sénescentes lors du doublement des lignées. On note des groupes de cultures « voisines » de quatre (image A) ou de huit (image B) selon la longueur de la période d'incubation.

unique, issu d'une ascospore uninucléée, à partir duquel on établit des lignées parallèles ; à chaque repiquage (tous les trois ou quatre jours selon les expériences), on prélève deux semis sur chaque culture ; on obtient ainsi chaque fois un doublement dichotomique des lignées, comme le schématise la figure 7. La filiation de chacune des lignées est notée avec soin dans une sorte de tableau généalogique végétatif.

Dans de telles expériences, l'existence d'une période d'incubation doit se traduire par une identité ou, tout au moins, une dispersion extrêmement faible dans les moments d'apparition de la sénescence des cultures d'origine proche. De plus, selon la longueur de la période d'incubation, le nombre des cultures « voisines » présentant des longévités comparables sera plus ou moins grand. Ainsi, une période d'incubation couvrant deux repiquages conduira à des cultures sénescentes groupées par quatre ; une période d'incubation correspondant à trois repiquages, à des cultures sénescentes groupées par huit (fig. 7).

De tels résultats ont été effectivement obtenus. Dans un premier essai, avec une souche S, un groupement régulier par huit des cultures sénescentes a été mis en évidence ; dans d'autres essais concernant d'autres thalles monospores de la même race, selon les conditions expérimentales le groupement était un peu moins régulier : on observait presque toujours soit des groupes de quatre, soit des groupes de huit cultures sénescentes. Ainsi, dans le cas de ces souches, le temps d'incubation paraît très voisin du temps qui sépare trois repiquages successifs. Sans faire, momentanément, d'hypothèse sur la nature du déterminant de la sénescence, cela revient à dire que ce déterminant était déjà présent dans le mycélium dix à quinze jours avant que les caractères aberrants ne se manifestent. Il se trouvait, de plus, sous une forme telle qu'il ne pouvait plus être perdu : on aboutissait nécessairement à la sénescence visible au bout de dix à quinze jours. Des groupements analogues ont été observés au cours de l'étude de toutes les souches qui ont été testées à cet effet ; seule l'importance des groupements varie avec la souche étudiée. Il semble que, dans tous les cas, il existe une période d'incubation dont la durée dépend de la souche utilisée. Toute hypothèse explicative devra donc nécessairement tenir compte de cette donnée.

D'une manière plus générale, nous aurons à rendre compte, d'une part, de l'apparition du déterminant efficace et, d'autre part, de l'évolution de ce déterminant. Nous savons déjà que cette apparition est aléatoire et que le déterminant conduira à la sénescence visible à la suite de la période d'incubation. Il existe ainsi dans la croissance d'une souche deux phases qui ne coïncident pas avec celles relatives à la morphologie du thalle (mycélium sénescent faisant suite au mycélium d'allure normale : fig. 8, *A*). La première de ces phases se poursuit jusqu'à l'apparition aléatoire du déterminant efficace de la sénescence ; la seconde comporte, en dehors de la période de croissance aberrante, une période de croissance apparemment normale

au cours de laquelle l'action du déterminant se généralise et s'accentue jusqu'à un seuil au-delà duquel le mycélium devient anormal (fig. 8, *B*).

Si l'apparition du déterminant sous sa forme efficace, c'est-à-dire si le déclenchement de la phase d'évolution du phénomène résulte d'un seul événement aléatoire, nous devrions être conduits à des courbes dont le palier correspondrait exactement à la période d'incubation. Si, au contraire, plusieurs événements sont nécessaires à la production de ce déterminant, le palier devrait correspondre à un temps de croissance plus long que la phase d'incubation. En fait, compte tenu de l'imprécision de nos mesures,

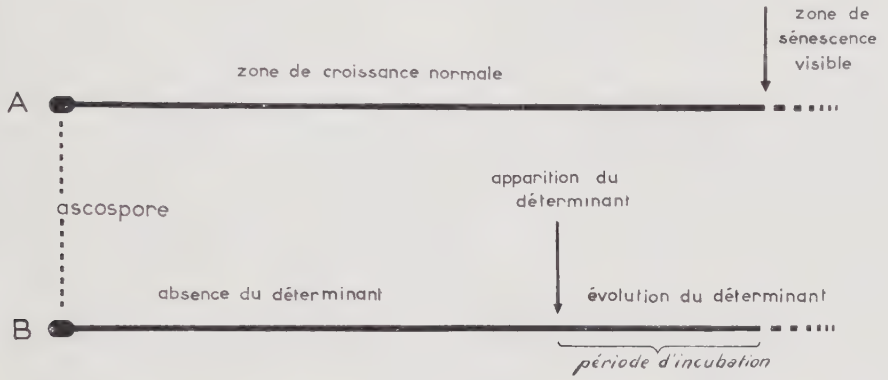


Fig. 8. — Schéma représentant les phases successives de l'évolution d'un mycélium en croissance continue. A : phases morphologiques (mycélium normal et mycélium sénescent) ; B : phases physiologiques (période correspondant à l'absence du déterminant et période correspondant à l'évolution de ce déterminant).

la durée du palier de la courbe de longévité d'une souche est assez voisine du temps d'incubation mesuré dans les mêmes conditions. Ainsi, pour la souche monospore S 13, le palier de la courbe de longévité correspond à un allongement de 12 à 15 cm environ et les cultures sénescentes, au cours des expériences de repiquage dichotomique, sont groupées par huit, ce qui conduit à une période d'incubation correspondant à une croissance de 11 à 14 cm.

On peut imaginer une autre méthode qui devrait permettre à elle seule de faire un choix entre les diverses hypothèses envisagées plus haut, à savoir : un seul événement aléatoire à manifestation différée, plusieurs événements à manifestation immédiate, plusieurs événements à manifestation différée. On peut opérer de la manière suivante. Lors de la croissance d'un mycélium en long tube, on peut prélever sur les fronts de croissance successifs, à des intervalles de temps constants, des séries de semis qui constitueront le point de départ d'autant de séries de lignées parallèles ; on peut ensuite mesurer la longévité de chacune des lignées et, par conséquent, construire une courbe de longévité pour chaque série.

A priori, il est possible de prévoir les caractéristiques de ces familles de courbes pour chacune des hypothèses possibles.

Dans le cas où le déterminant correspondrait à un événement unique à manifestation différée, on devrait aboutir à deux types de courbes très distinctes : celles qui correspondent aux semis prélevés avant l'apparition du déterminant et celles qui correspondent aux semis prélevés durant la

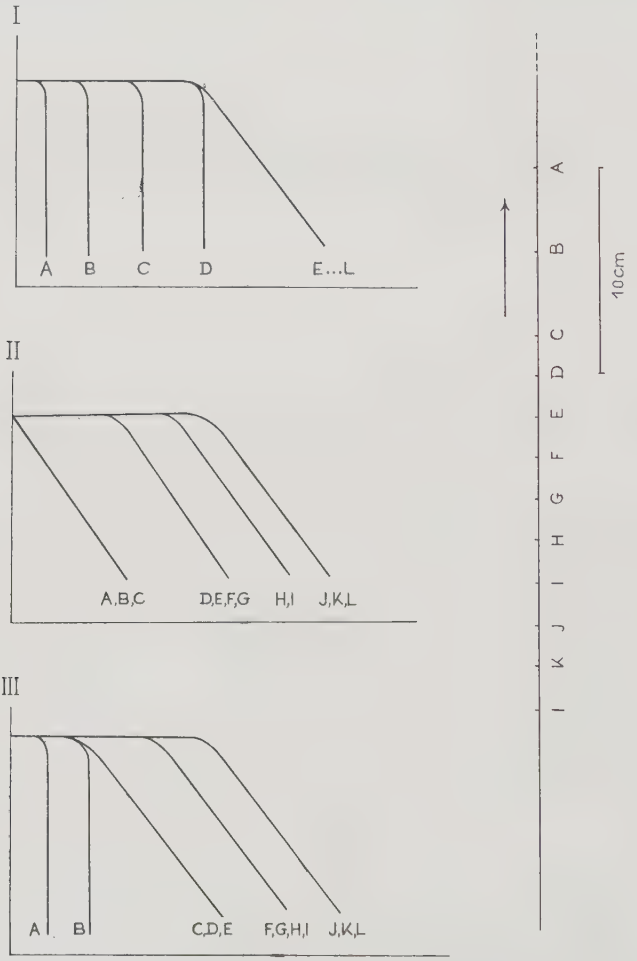


Fig. 9. — Courbes théoriques de longévité correspondant à de nombreux semis prélevés au même niveau (A ou B ou C, etc.) lors de la croissance d'une lignée. Dans chacune des images I, II et III, les courbes A, B, C, D, E, etc., correspondent à des semis prélevés à des distances croissantes des extrémités sénescentes.

Les courbes de l'image I correspondent à l'hypothèse d'un événement unique et aléatoire (courbe à un coup) à manifestation différée ; les courbes de l'image II à l'hypothèse où plusieurs événements aléatoires, indépendants et successifs, sont nécessaires, le dernier étant à manifestation immédiate (courbes à plusieurs coups). L'image III concerne encore une courbe à plusieurs coups, mais dont le dernier est à manifestation différée.

période d'incubation. Les premières devraient être superposables à la courbe de longévité normale de la souche. Les secondes devraient toutes traduire des longévités réduites, ces longévités devant être d'autant plus courtes que les semis ont été prélevés plus près de la zone de sénescence visible. En principe, ces dernières courbes devraient montrer un palier de plus en plus réduit et leur pente devrait correspondre à des verticales (fig. 9, I : courbes A, B, C et D).

Dans le cas où la sénescence résulterait de plusieurs événements à manifestation immédiate (courbes à plusieurs coups), on devrait aboutir à des courbes de pente uniforme, mais dont les paliers seraient de plus en plus réduits (fig. 9, II).

Dans l'hypothèse plus complexe où il s'agirait également d'une courbe à plusieurs coups, mais à manifestation différée, cela devrait se traduire par les courbes représentées dans la figure 9, III qui peut être regardée comme une combinaison des figures 9, I et 9, II : les semis prélevés avant la période d'incubation conduiraient à des courbes à paliers variables mais à pentes à peu près normales telles que celles représentées dans la figure 9, II ; les semis prélevés durant la période d'incubation, à des courbes identiques à celles de la figure 9, I.

Contrairement à la figure 9, II, les figures 9, I et 9, III traduisent l'existence d'un seuil au-delà duquel les pentes varient brutalement. Ces deux dernières figures se distinguent facilement l'une de l'autre par la place de ce seuil et par le fait que toutes les courbes qui le précèdent dans la figure 9, I se ramènent à une seule : la courbe de longévité normale. On réalise donc clairement qu'une telle expérience serait de nature à nous permettre un choix entre les diverses hypothèses possibles.

Malheureusement, cette expérience est techniquement très difficile à réaliser sous cette forme. Elle requiert, en effet, des prélèvements très nombreux, à des périodes très rapprochées, sur une culture en long tube depuis son origine jusqu'à l'apparition de la sénescence visible ; or, en cours de croissance, de tels prélèvements sont pratiquement impossibles. La figure 9 exprime clairement qu'il faut opérer avec une souche pour laquelle la pente est très différente de la verticale et nous avons vu plus haut qu'il s'agit alors forcément d'une souche dont la longévité moyenne est relativement grande. Cela reviendrait à faire des séries de prélèvements trop nombreuses pour que l'expérience soit matériellement réalisable.

Nous n'avons pu réaliser cette expérience que d'une manière très imparfaite en prélevant des séries de semis non pas en cours de croissance, mais au moment où la souche commençait à manifester un phénotype sénescent. Nous avons limité ces prélèvements au mycélium correspondant aux 30 derniers centimètres (18 séries de 30 semis à 4, 8, 12, 14, 16... 30 cm de l'extrémité sénescente). L'expérience a montré qu'il n'y avait aucun intérêt à remonter plus loin. Mais il est impossible de savoir si les semis obtenus de cette manière conduisent aux mêmes résultats que ceux que

l'on prélèverait au même niveau en cours de croissance. Pour la souche S 13, les courbes obtenues sont groupées dans la figure 10. On lit sur cette figure qu'à 18 cm ou plus de la zone anormale les courbes obtenues (*f*, *g*..., *l*) ne sont pas significativement différentes de la courbe témoin (courbe de longévité normale de la souche étudiée) ; les courbes correspondant aux prélèvements les plus proches de la zone sénescente montrent un palier

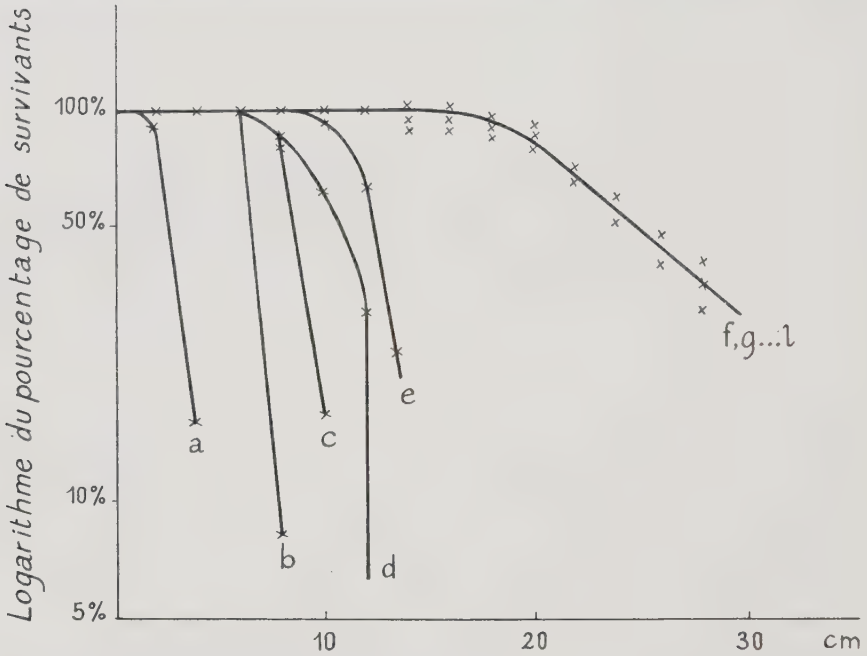


FIG. 10. — Courbes de longévité correspondant chacune à un groupe de trente semis prélevés au même niveau et à des distances de 4 cm (*a*), 8 cm (*b*), 12 cm (*c*), 14 cm (*d*), 16 cm (*e*), 18 cm (*f*),.. 30 cm (*l*) de l'extrémité sénescente d'un mycélium cultivé en long tube. La totalité des semis ont été prélevés une fois la croissance terminée. Les courbes correspondant à des distances de 18 cm ou plus sont pratiquement superposées.

qui diminue très rapidement et une pente extrêmement forte, sans que la droite correspondante ne se superpose toutefois avec la verticale. Toutes ces pentes, même celle de la courbe *e*, la plus voisine de la courbe *f*, et qui correspond aux prélèvements effectués à 16 cm de l'extrémité sénescente, se distinguent sans aucune ambiguïté de la pente de la courbe témoin. Cette famille de courbes est donc significativement différente de celles des figures 9, II et 9, III. Par contre, elle se rapproche de celle de la figure 9, I et il est possible de voir là une confirmation de l'hypothèse déjà étayée plus haut par d'autres observations, à savoir que la sénescence résulte d'un seul événement à manifestation différée.

On note cependant entre les courbes théoriques (fig. 9, I) et les courbes expérimentales (fig. 10) quelques différences qui méritent d'être signalées.

Dans la figure 10, pour les séries de lignées à longévités réduites, les droites faisant suite aux paliers ne sont pas absolument verticales, ce qui signifie qu'à l'intérieur d'une même série de lignées les longévités ne sont pas strictement égales. De plus, ces lignées ont des longévités plus réduites que si les semis avaient été prélevés au même niveau, mais en cours de croissance : par exemple, les semis découpés à 4 cm de l'extrémité sénescente conduisent, pour la plupart, à des cultures dont le rayon ne dépasse pas 2 cm. La longueur du palier de la courbe témoin qui doit correspondre sensiblement à la durée de la période d'incubation est de 12 à 14 cm ; or, les semis prélevés à 16 cm de l'extrémité sénescente conduisent à une courbe qui traduit une longévité moyenne nettement réduite.

Ces faits ne nous paraissent pas de nature, au moins dans le cas de cette expérience particulière, à diminuer la valeur de la conclusion à laquelle nous avons abouti. Ils sont plutôt, comme nous le verrons bientôt (chap. III), des manifestations d'un autre phénomène : le caractère infectieux de la sénescence.

4° Conclusion.

En résumé, chez les Champignons, et en particulier chez le *Podospora anserina*, la sénescence se présente comme une maladie inévitable qui atteint les extrémités des hyphes et arrête l'allongement du mycélium. Elle apparaît chez toutes les souches du *Podospora anserina* qui ont été étudiées à ce point de vue, mais après des temps variables de croissance. De nombreuses autres espèces manifestent le même phénomène avec des modalités très voisines.

Bien que ce phénomène soit inéluctable, son apparition n'en est pas moins aléatoire, comme le traduisent les longévités différentes des lignées parallèles issues d'un même thalle homocaryotique.

Cette dispersion ne s'oppose pas à l'existence, pour chaque souche et dans des conditions données, d'une longévité moyenne caractéristique et elle se traduit par une courbe caractéristique.

Longévité moyenne et courbes de longévité sont des caractères héréditaires dont le maintien, au cours des générations successives, a été vérifié dans plusieurs cas. Pour la race S, cette vérification a été faite au cours d'expériences portant sur vingt générations.

Quelle que soit la souche utilisée, les courbes de longévité présentent toutes la même forme générale. L'existence d'une période de croissance normale minimale précède toujours la sénescence visible. L'apparition de celle-ci se présente comme un phénomène aléatoire.

La production d'un seul événement paraît suffisante pour rendre compte des résultats. Elle est suivie d'une période d'incubation au cours de laquelle l'action du déterminant se généralise et s'accentue jusqu'à un seuil au-delà duquel le mycélium devient anormal.

Ainsi, il existe bien deux phases physiologiques au cours de la croissance d'une souche, mais elles ne se superposent pas aux phases morphologiques observées. La première serait caractérisée par l'absence du déterminant dont l'apparition est aléatoire ; la seconde correspondrait à l'évolution de ce déterminant, et la sénescence visible n'en constituerait que la partie terminale d'apparence pathologique.

CHAPITRE II

LES FACTEURS DE VARIATIONS DE LA LONGÉVITÉ

Lorsque le phénomène de sénescence a été mis en évidence chez le *Podospora anserina*, les premières hypothèses formulées quant à son déterminisme faisaient appel soit à une carence du milieu nutritif, soit à une altération de celui-ci par accumulation de substances nocives excrétées par le mycélium, soit à une intoxication des hyphes par des produits du métabolisme qui inhiberaient la croissance.

Très rapidement, il s'est avéré que l'existence d'une carence alimentaire était peu probable. La sénescence se produit sur tous les milieux utilisés, naturels ou artificiels, synthétiques ou non, et même sur le crottin de cheval sur lequel l'espèce croît normalement. Le changement de milieu nutritif durant la période d'incubation ne conduit à aucune guérison ; l'adjonction de sucres, de facteurs de croissance variés, d'oligo-éléments ne change rien à cette situation ; bien au contraire, lorsque dans un milieu nutritif artificiel on augmente la concentration des substances essentielles, la sénescence apparaît généralement plus tôt. Chez le *Pestalozzia annulata*, du mycélium sénescent placé sur un milieu très pauvre ne présente plus les symptômes du phénomène ; cependant, le déterminant n'est pas touché puisque les hyphes reprennent leur caractère sénescent dès qu'elles sont repiquées sur du milieu normal (Chevaugeon et Digbeu, 1960).

L'hypothèse d'une altération du milieu s'est révélée tout aussi peu satisfaisante. En effet, pourquoi cette altération ne se manifesterait-elle pas au cours des premiers repiquages ? Pourquoi un semis neuf déposé dans une boîte de milieu gélosé au voisinage d'un thalle sénescent croît-il normalement ? Pourquoi en est-il de même si le semis est placé dans le filtrat d'une culture réalisée en milieu liquide et déjà visiblement sénescente ? Enfin, pourquoi l'élévation de la fréquence des repiquages sur du milieu neuf, loin d'augmenter la longévité, la diminuerait-elle d'une manière significative comme nous le verrons bientôt ?

On connaît chez plusieurs Champignons des exemples d'arrêt de croissance paraissant résulter de dysharmonie dans le métabolisme : c'est sans doute le cas général dans la croissance en « vagues » successives (croissance rythmique) où une croissance très ralentie fait suite régulièrement à un allongement rapide (Chevaugeon, 1959 *a*, 1959 *b*). Mais, dans ce cas, à

chaque vague succède une autre vague tout aussi riche en mycélium, alors que, chez le *Podospora*, on note seulement en fin de croissance une certaine irrégularité dans la densité des filaments, les extrémités de certains d'entre eux échappant un peu plus longtemps que les autres au vieillissement (Pl. II, *A*). Vu sous cet angle, comme dans le cas de la souche *nd* du *Neurospora crassa* décrit par Sheng (1951), l'hypothèse d'une intoxication aurait pu provisoirement être retenue.

Mais deux groupes de faits évoqués au chapitre précédent nous paraissent incompatibles avec cette idée : vingt générations sexuelles successives ont pu être obtenues sur moût de maïs gélosé sans que ni la croissance, ni la fructification, ni la germination des ascospores aient été réalisées sur d'autres milieux ; à la vingtième génération, les mycéliums naissaient aussi jeunes que ceux de la première génération et avaient une potentialité de croissance comparable ; or, cette expérience implique une augmentation de masse énorme, bien supérieure à celle qui correspond à la longévité des souches utilisées. Enfin et surtout, une carence nutritive, une altération du milieu ou une intoxication sont des processus dont on voit mal comment ils s'accommoderaient des longévités très différentes des diverses lignées parallèles d'une même souche. Le caractère aléatoire du déclenchement de la période d'incubation ne permet pas de retenir cette idée, au moins sous sa forme la plus simple.

Si les premières expériences n'ont permis ni d'empêcher l'apparition de la sénescence, ni d'en comprendre le mécanisme profond, plusieurs d'entre elles ont révélé que le milieu pouvait modifier considérablement la longévité moyenne et la courbe de longévité d'une souche. Nous avons vu, au cours du chapitre précédent, qu'il était possible d'aborder l'étude du déterminisme de la sénescence en analysant les courbes de longévité : il nous a donc paru intéressant d'examiner si les modifications subies par ces courbes sous l'influence de divers facteurs du milieu n'étaient pas de nature à préciser ou, au moins, confirmer les hypothèses auxquelles nous avons été conduits.

Nous avons étudié l'influence de la température, de l'éclairement, du génotype, de la taille des semis utilisés au cours des repiquages et de la fréquence de ces repiquages sur la longévité d'un certain nombre de souches.

1° Variation de la longévité en fonction de la température.

L'expérience la plus étendue et la plus précise porte sur la souche S 137. Quatre séries de cultures parallèles (300 pour chaque série) ont été obtenues à partir d'un même mycélium homocaryotique (issu d'une spore uninucléée). Ces séries ont été entretenues dès l'origine, la première à 16° C (température limite au-dessous de laquelle la croissance est très faible),

la seconde à 20° C, la troisième à 24° C et la quatrième à 28° C. Ces cultures ont été faites en tubes à essai sur moût de maïs gélosé, l'épaisseur du milieu nutritif étant constante sur toute la longueur des tubes ; pour les repiquages, des semis de taille uniforme étaient prélevés à l'emporte-pièce sur le pourtour de la culture précédente et, dans tous les cas, un repiquage était effectué lorsque l'allongement du mycélium correspondait à 3,5 cm environ de part et d'autre du semis. Ainsi, les repiquages étaient effectués tous les 14 jours à 16° C, tous les 9 jours à 20° C, tous les 6 jours à 24° C et tous les

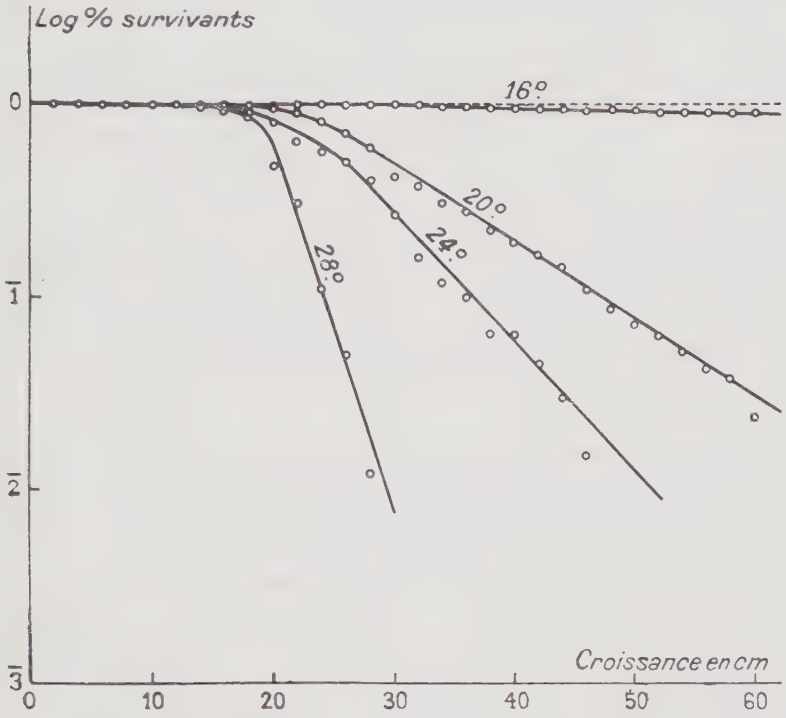


Fig. 11. — Courbes de longévité de la souche S 137 établies chacune à partir de 300 lignées parallèles aux températures de 16° C, 20° C, 24° C et 28° C.

4 jours à 28° C. Dans toutes ces expériences, la longévité de chaque lignée a été mesurée par l'allongement du mycélium. Évidemment, les chiffres obtenus aux diverses températures ne sont réellement comparables que si un allongement de 1 cm, par exemple, correspond à une augmentation de masse égale dans les diverses conditions expérimentales : nous savons seulement qu'aux diverses températures utilisées la morphologie du thalle et la densité des filaments ne présentent pas de différences décelables.

Chacune de ces séries d'expériences nous a permis d'établir une courbe de longévité et les quatre courbes ainsi obtenues sont groupées dans la figure 11. Nous avons pu calculer également pour chacune de ces séries

les longévités moyennes : 70 cm à 16° C, ce qui correspond à 270 jours de croissance; 30 cm à 20° C, ce qui correspond à 71 jours de croissance; 26 cm à 24° C, ce qui correspond à 47 jours de croissance; 20 cm à 28° C, ce qui correspond à 29 jours de croissance.

Ces résultats et l'examen de la figure 11 permettent de dégager les conclusions suivantes : 1° la longévité moyenne diminue au fur et à mesure que la température s'élève ; 2° les courbes obtenues présentent toutes la même forme générale déjà décrite au chapitre précédent (la succession d'un palier et d'une droite dont la pente traduit la dispersion dans l'apparition de la sénescence au sein d'une même série de cultures parallèles) ; 3° pour les quatre courbes, on obtient des paliers sensiblement égaux, ce qui signifie que, quelle que soit la température, la longévité la plus courte observée est sensiblement la même ; 4° par contre, les pentes des droites obtenues varient considérablement avec la température ; elles sont d'autant plus fortes que la température est plus élevée (à 28° C, dans une même série de cultures parallèles, la dispersion dans l'apparition de la sénescence est faible, alors qu'à 16° C cette dispersion est très considérable) ; 5° le cas de la courbe obtenue à 16° C pose d'ailleurs un problème intéressant, car la pente est si faible qu'il est permis de se demander si, à une température encore légèrement plus basse, on ne réussirait pas à éviter l'apparition de la sénescence.

Des expériences du même type que les précédentes ont été faites avec d'autres souches S, les températures étant parfois un peu différentes de celles citées plus haut (pour la souche S 1489 : 18° C, 21° C, 27° C et 30° C). Les résultats, un peu moins complets pour chaque souche prise isolément, conduisent exactement aux mêmes conclusions.

Enfin, d'autres expériences ont été réalisées à 36° C, non seulement pour des souches S, mais également pour des souches d'origines différentes ; dans ces cas, les longévités sont toutes très faibles et, lorsque les cultures sont faites en boîtes de Pétri, la sénescence devient évidente et l'arrêt de croissance se produit le plus souvent avant que le thalle n'ait recouvert toute la surface du milieu. Ainsi, à cette température, la longévité moyenne d'une souche diminue considérablement et toutes les lignées deviennent sénescentes presque simultanément ; le palier est très court (bien inférieur à celui trouvé aux températures plus basses) et la dispersion devient quasi nulle.

2° Variation de la longévité en fonction de l'éclairement.

Même lorsqu'on sait qu'une certaine quantité de lumière est indispensable à la formation des périthèces, la variation de la longévité en fonction de l'éclairement est assez inattendue et nous ne l'aurions sans doute pas

soupçonnée *a priori*. C'est en essayant de comprendre l'hétérogénéité de certains résultats, alors que les conditions expérimentales paraissaient homogènes, que l'importance de ce facteur est apparue. Plusieurs séries d'expériences ont alors été faites pour étudier son action. Les plus étendues et les plus précises concernent trois souches S homocaryotiques : deux souches « sauvage » (S 93 + et S 17 —) et une souche *Incolore* (*I* 12 —). Dans les deux premiers cas, les cultures ont été faites à 26° C, dans le troisième à 30° C, les repiquages étant effectués tous les trois ou quatre jours. Pour les unes et les autres, nous avons étudié deux séries de cultures parallèles comprenant 150 lignées chacune. Les deux séries ont été entretenues en même temps dans la même étuve : l'une était maintenue à l'obscurité, les tubes étant emballés par groupe dans du papier ou du tissu noir et le tout étant enfermé dans une boîte opaque mais aérée ; l'autre était soumise à un éclairage continu à l'aide de tubes fluorescents.

On a constaté que, dans ces conditions, pour la souche S 93 comme pour la souche S 17, la vitesse de croissance était la même pour les deux

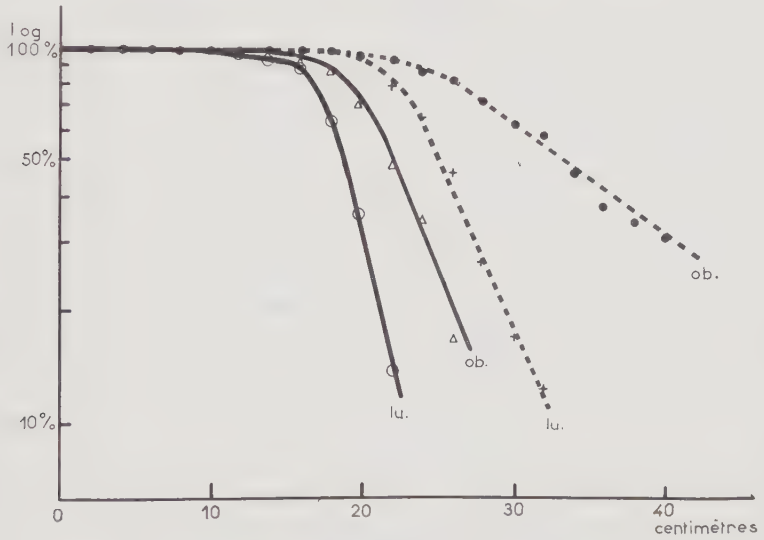


Fig. 12. — Courbes de longévité correspondant chacune à 150 cultures faites soit en lumière continue (*lu*), soit à l'obscurité (*ob*) pour les souches S 17 (traits pleins) et S 93 (traits discontinus).

séries ; il en était de même de la densité, de la morphologie et de la pigmentation du mycélium pour lesquelles aucune différence n'était décelable. Au contraire, une différence très nettement significative s'est révélée lorsque nous avons mesuré les longévités moyennes. Pour la souche S 93, cette longévité était de 35,2 cm à l'obscurité (correspondant à 58 jours de croissance) et de 26 cm à la lumière (43 jours de croissance). Pour la souche S 17, les chiffres correspondants étaient respectivement de 22,1 cm et de 19,1 cm. Ces différences apparaissent encore plus nettement lorsqu'on

compare les courbes de longévité : pour chacune des souches, les paliers correspondant à l'obscurité et à la lumière sont sensiblement égaux, mais les pentes sont nettement différentes (fig. 12) ; la différence la plus nette est relevée dans le cas de la souche S 93 pour laquelle la dispersion dans l'apparition de la sénescence est beaucoup plus grande pour la série cultivée à l'obscurité que pour celle maintenue à la lumière continue.

Dans le cas de la souche *I* 12, les cultures réalisées à la lumière produisent beaucoup de microconidies, alors que celles maintenues à l'obscurité n'en produisent pratiquement pas : il est donc difficile de comparer leur croissance avec précision. Toutefois, toutes les lignées cultivées à la lumière étaient devenues sénescentes à un moment où aucune de celles maintenues à l'obscurité ne manifestait de symptômes du même phénomène : il ne fait aucun doute que la longévité de cette souche est plus grande lorsqu'elle est cultivée à l'obscurité.

3° Variation de la longévité en fonction du génotype.

Nous avons vu au chapitre précédent que, dans des conditions homogènes, la longévité moyenne est une caractéristique de chaque souche et que des souches différentes, comme les souches des diverses races géographiques, avaient des longévités moyennes nettement distinctes. Dans le cas de ces races, les résultats traduisent une influence énorme du génotype sur la longévité, mais, comme elles diffèrent par de très nombreux gènes, il s'agit d'une influence globale qui serait sans doute très difficile à analyser. Si certains gènes jouent un rôle particulièrement important dans le déterminisme de la longévité, il devrait être beaucoup plus facile de le mettre en évidence en étudiant le comportement de nombreux mutants monogéniques issus d'une même souche.

L'influence de l'un des *loci*, celui qui gouverne l'hétérothallisme, a été décelée à la suite d'expériences déjà décrites (Rizet, 1953 *b*). Pour déterminer la longévité caractéristique de la « race » S, un grand nombre de mycéliums homocaryotiques, issus d'un même croisement, ont été utilisés : un examen des croissances individuelles de ces souches a révélé que ce sont en général les souches — qui deviennent sénescentes les premières. Si on construit deux courbes de longévité, l'une pour les souches +, l'autre pour les souches —, elles sont nettement distinctes. Il nous a paru d'autant plus intéressant de préciser l'influence du couple +/— qu'aucune autre différence morphologique ou biologique n'est actuellement connue entre les souches de signes complémentaires.

Il était nécessaire, tout d'abord, de définir s'il s'agissait bien de l'influence du couple +/— lui-même ou de gènes qui lui sont étroitement liés et qui, dans ce cas, devraient conduire à de rares recombinaisons. On devait

ensuite montrer que cette dissymétrie se rencontrait non seulement dans les souches S, mais également dans des souches de génotypes très différents (souches de races variées).

Plusieurs centaines de souches S issues d'ascospores uninucléées ont été étudiées sans qu'aucune recombinaison ne soit décelée. Dans ces expériences, la longévité de chaque souche est calculée en utilisant plusieurs lignées parallèles ; ces longévités se répartissent nettement en deux groupes : celles des souches + et celles des souches —.

Pour chacune des races A, B, C, M, N et S, nous avons établi deux courbes de longévité, l'une à partir d'une cinquantaine de souches —, l'autre à par-

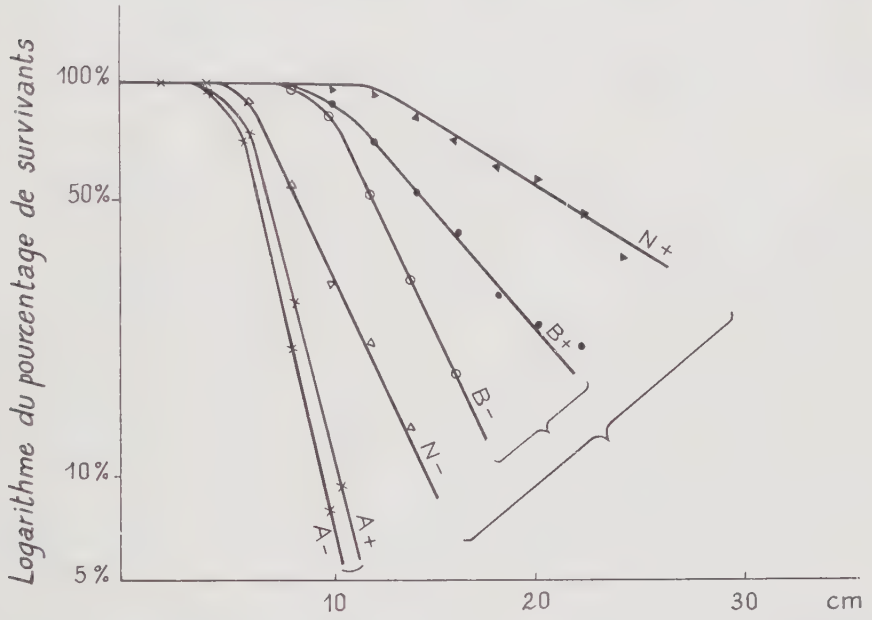


Fig. 13. — Courbes de longévité comparatives de mycéliums de signe + et de mycéliums de signe — des souches A, B et N.

tir d'une cinquantaine de souches + ; chaque souche était issue d'une seule spore uninucléée et toutes les spores correspondant à une même race résultaient d'un même croisement ; pour certaines de ces races (A, N et S), l'expérience a été faite à deux reprises. La figure 13 réunit les paires de courbes correspondant aux souches A, B et N et schématisent l'ensemble des résultats obtenus : 1° dans le cas de la race A, on ne note aucune différence entre la longévité des souches + et celle des souches — (il en est de même pour les souches M et C) ; 2° dans le cas de la race B, les mycéliums + montrent une longévité significativement plus grande que les mycéliums — (il en est de même pour les souches S) ; 3° enfin, pour la race N, la diffé-

rence de longévité en faveur des thalles + est beaucoup plus considérable (on retrouve des résultats encore plus nets que ceux fournis par les souches S) ; 4° pour chacune des paires de courbes correspondant aux signes + et — d'une même race, les paliers sont sensiblement analogues (à l'exception de ceux correspondant aux souches N) et, lorsqu'une différence se manifeste, elle ne porte que sur les pentes.

On peut résumer ces faits de la manière suivante : la longévité des souches — n'est jamais supérieure à celle des souches + de même origine ; dans quelques cas (souches M, A et C), la différence en faveur des souches + est faible si elle n'est pas nulle ; dans la plupart des autres cas, nous retrouvons les résultats obtenus avec les souches S : les mycéliums + ont une longévité plus grande que les mycéliums — ; la différence, qui porte principalement sur la pente des deux droites, est parfois très considérable (souches B et N). Ces résultats sont en faveur de l'influence du signe lui-même sur la longévité, cette influence pouvant sans doute être tempérée, pour certaines souches, par le reste du génotype.

Nous avons déjà signalé la longévité importante de certaines souches portant le gène *I*. Les expériences réalisées à partir de croisements $I \times i$ (Rizet, 1953 *b*) montrent qu'il s'agit soit de l'influence du gène *I* lui-même, soit de gènes qui en sont très voisins sur le même chromosome. Pour choisir entre ces deux hypothèses, nous aurions pu étudier, comme dans le cas du signe, la longévité d'un grand nombre de souches homocaryotiques issues du croisement $I \times i$. Mais, d'une part, cette technique pouvait se révéler longue et laborieuse, et, d'autre part, nous disposions d'une méthode apparemment plus simple et plus sûre. Les hétérocaryotes $I + i$ ont le phénotype mutant et évoluent rapidement vers l'état homocaryotique *I* par élimination des noyaux *i*. Ainsi, lorsque dans un mycélium *i* une mutation *i* vers *I* se produit, on aboutit rapidement à un secteur incolore immédiatement décelable. On obtient ainsi une culture présentant deux types mycéliens bien distincts qui ne diffèrent que par un seul gène (*I* pour l'un et *i* pour l'autre) et dont il suffira de comparer les longévités. Pratiquement, cela revient à prélever sur l'un et l'autre des secteurs de nombreux semis qui seront le point de départ de deux groupes de lignées parallèles dont on mesurera les longévités moyennes.

Dans une expérience de ce type, on peut mettre en évidence, sans aucune ambiguïté, l'influence d'un gène défini. Il est beaucoup plus difficile de connaître la valeur exacte de la longévité qui lui correspond ; la mesure effectuée porte en effet sur un mycélium qui présente plusieurs états successifs : mycélium homocaryotique originel, mycélium hétérocaryotique obtenu à la suite de la mutation et enfin mycélium ne contenant plus que des noyaux mutés.

Une expérience étendue a été réalisée à partir de la souche monocaryotique S 16 +. Celle-ci a été entretenue tout d'abord par repiquages succes-

sifs très espacés, c'est-à-dire dans des conditions où la croissance n'est pas continue. Les premiers repiquages ont révélé un mycélium homogène, puis l'une des cultures a présenté un secteur incolore. A ce moment, deux séries de 100 semis chacune ont été prélevées, l'une sur le secteur incolore, l'autre sur le secteur phénotypiquement sauvage. Les deux séries de cultures parallèles ont été entretenues jusqu'à l'apparition de la sénescence et on a construit pour chaque série une courbe de longévité. Ces deux courbes sont groupées dans la figure 14. Elles ne se rapportent qu'à la phase de la croissance postérieure à l'établissement des lignées : les paliers sont sensiblement égaux ; la différence très nette en faveur des lignées *I* ne porte que

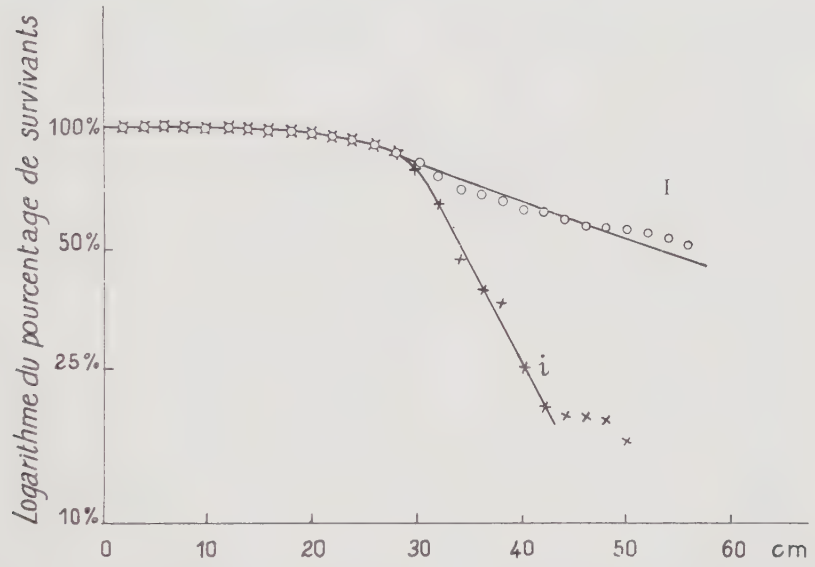


Fig. 14. — Courbes de longévité de deux souches provenant de deux secteurs d'une même culture S 16 : un secteur muté *Incolore* et un secteur « sauvage ». Chacune des courbes a été établie à partir de 150 lignées parallèles.

sur la pente. Il est possible que cette différence soit sous-estimée ; les observations faites montrent en effet que certaines des lignées supposées « sauvage » étaient à l'origine hétérocaryotiques ($I + i$), ce qui a pu, dans des limites d'ailleurs très mal connues, augmenter leur longévité. Quoi qu'il en soit, il est visible sur la figure 14 que la longévité moyenne des mycéliums *I* est très supérieure à celle des mycéliums *i* provenant de la même culture originelle. Il apparaît donc que cette différence doit être attribuée à la substitution du gène *I* à son allèle *i*. Si l'on envisage la pente de la courbe correspondant à la longévité des souches *I*, on note que cette pente est nettement plus grande que celle correspondant à la longévité des souches *I* étudiées antérieurement ; cela n'a rien d'étonnant puisqu'on sait que la mutation de plusieurs *loci* conduit au phénotype incolore (Esser, résultats non publiés) et que, pour l'un au moins de ces *loci*, on connaît un

certain nombre d'allèles (Rizet et Engelmann, 1949). Il est donc fort possible qu'il ne s'agisse pas du même gène que celui présent dans les souches *I* testées antérieurement, et, dans ce cas, il faudrait en conclure que l'un et l'autre de ces gènes conduisent à un accroissement considérable de la longévité.

4° Variation de la longévité en fonction de la taille des semis utilisés pour les repiquages et de la fréquence de ceux-ci.

On savait déjà (Rizet, 1953 *b*) que la longévité moyenne d'une souche entretenue par repiquages successifs était plus faible lorsqu'on prélevait des

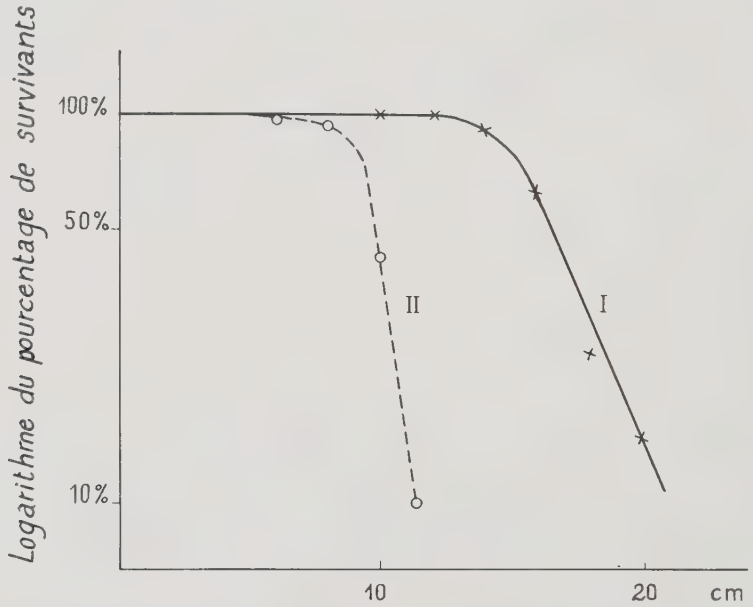


Fig. 15. — Courbes de longévité de la souche S 73 entretenue soit par semis de taille habituelle (I), soit par de très petits semis (II). Chacune de ces courbes résulte de l'étude de 200 lignées parallèles.

semis de petite taille (1 mm) que des semis de taille habituelle (3-4 mm). Nous avons vérifié cette conclusion, en particulier en utilisant la souche S 73 — et en prenant quelques précautions supplémentaires : les semis étaient prélevés de telle sorte que tous contenaient des extrémités de filaments en croissance ; les petits semis étaient découpés à l'aide d'une aiguille, de sorte que chacun d'eux emportait un nombre de filaments beaucoup plus faible que dans les expériences réalisées antérieurement ; quelle que soit la taille des semis, les repiquages étaient faits tous les quatre jours. Ces deux séries de lignées nous ont permis d'établir des courbes de longévité groupées dans la figure 15. Les pentes des droites sont différentes :

la dispersion est plus grande dans la série correspondant aux gros semis. Mais la variation la plus évidente concerne le palier, beaucoup plus court dans le cas des lignées entretenues à l'aide de petits semis. Dans le cadre de l'hypothèse formulée antérieurement, cela revient à dire que la période d'incubation peut varier dans de larges limites et qu'elle est considérablement diminuée si les repiquages sont faits au moyen de semis de très petite taille.

Ces résultats dépendent-ils de la taille des semis ou du fait que les petits semis n'emportent guère que des extrémités de filaments en croissance ? Afin de choisir entre ces deux hypothèses, nous avons recommencé l'expérience précédente avec la souche S 20 — en prélevant sur une même culture originelle, non plus deux, mais trois séries de 150 semis : des semis de taille normale découpés sur le pourtour de la culture, des semis de très petite taille prélevés soit au niveau des extrémités en croissance, soit à 2 ou 3 mm de ces extrémités. En repiquant les thalles tous les quatre jours, nous avons obtenu des longévités moyennes de 25 cm dans le cas des gros semis, 9,9 cm dans le cas des petits semis correspondant aux extrémités en croissance, 12.7 cm dans le cas des petits semis prélevés en arrière de ces extrémités.

Les semis de petite taille, quelle que soit leur origine, conduisent donc à une modification très nette de la longévité. La faible différence correspondant au lieu de prélèvement est peut-être significative, mais elle pourrait être la conséquence du fait qu'au niveau des extrémités en croissance la densité des filaments est plus faible. C'est pourquoi la même expérience a été refaite en prélevant les petits semis sous la loupe binoculaire et en vérifiant que tous emportaient à peu près le même nombre de filaments. Cette nouvelle expérience, effectuée à partir de la même souche, a donné les longévités moyennes suivantes : 25 cm pour les gros semis, 8,8 cm pour les petits semis correspondant aux extrémités en croissance, et 9,1 cm pour les petits semis du deuxième type. Il apparaît donc clairement que le facteur important est constitué par le nombre des filaments emportés par le semis.

Plusieurs indications nous avaient suggéré qu'un autre facteur, la fréquence des repiquages, jouait également un rôle important dans le déterminisme de la longévité. L'expérience la plus simple que l'on puisse réaliser pour tester cette hypothèse revient à supprimer complètement les repiquages en entretenant les thalles en très longs tubes. De tels essais ont été réalisés pour des souches nombreuses : chaque fois, l'absence de repiquage a entraîné une augmentation considérable de la longévité. On comprend facilement que les résultats obtenus soient assez variables puisque, dans le cas des cultures en longs tubes, on ne peut tester pour une même souche que quelques lignées. Mais tous les résultats, sans exception, appuient l'idée qui vient d'être émise : dans le cas de la souche S 1385, par exemple, la longévité moyenne est de 43 cm si les cultures sont faites en petits tubes par repiquages successifs, alors que les cinq lignées entretenues en longs tubes sont devenues sénescentes après 64,2 cm, 64,4 cm, 63,3 cm, 65,6 cm et 56,5 cm

de croissance ; il est même très fréquent, et cela a été observé pour des souches variées, d'obtenir sans repiquage des longévités deux ou trois fois plus grandes que celles correspondant à des repiquages successifs.

L'absence de repiquage peut être assimilée à l'utilisation de semis de très grande taille, mais les résultats obtenus pourraient être également en relation avec l'absence de période de latence qui, dans le cas des semis successifs, accompagne chacun des repiquages. Pour tester cette hypothèse, on peut comparer la longévité de série de lignées parallèles issues d'une même souche, repiquées à partir de semis de taille homogène mais à des intervalles de temps différents. De telles expériences ont été faites à partir de la souche S 20, les semis étant faits soit tous les quatre jours (voir plus haut), soit tous les jours. Trois séries d'expériences de ce type ont été réalisées afin de combiner l'étude de l'influence des caractéristiques des semis (taille et origine) et celle de la fréquence des repiquages. Dans le cas où des repiquages sont effectués tous les jours, à la place des chiffres trouvés plus haut (25 cm, 8,8 cm, 9,1 cm) on a trouvé respectivement : 9,5 cm, 2,8 cm et 2,8 cm. Il ne fait ainsi aucun doute que la longévité d'une souche est beaucoup plus courte si les repiquages sont plus fréquents. Par ailleurs, des chiffres aussi petits que 2,8 confirment sans aucune ambiguïté que, pour une souche donnée, le palier des courbes, tout comme les pentes, peut avoir des valeurs très différentes selon les conditions de culture.

5° *Conclusion.*

Au cours du chapitre I, nous avons montré que, dans les conditions habituelles de culture, la longévité d'une souche peut être traduite par une courbe définie par deux paramètres : la longueur du palier et la pente de la droite qui lui fait suite. Nous avons vu que ces paramètres variaient selon les races étudiées, mais que, dans les conditions expérimentales réalisées, il paraissait exister une relation constante entre la longueur du palier et la pente de la droite. Si l'on en juge par les résultats obtenus au cours du présent chapitre et rapportant des expériences faites dans des conditions beaucoup plus variées, ces relations sont moins simples qu'il n'apparaissait.

Nous avons étudié d'abord l'action du génotype sur la longévité ; nous avons montré ensuite que, pour une souche donnée, la longueur du palier et la pente de la droite dépendent d'un certain nombre de facteurs du milieu (température, éclairement, taille des semis et fréquence des repiquages).

L'action du génotype se manifeste globalement par une très grande diversité des longévités moyennes des souches d'origine différente. Dans le cas des souches S, les mycéliums portant le gène *I* ont une longévité beaucoup plus grande que ceux portant son allèle *i*. Les souches + et les

souches — d'une même race ont le plus souvent des longévités différentes et, dans ce cas, la plus grande longévité correspond toujours à l'allèle +.

La longévité moyenne d'une souche est d'autant plus faible que les cultures sont réalisées à des températures plus élevées. A l'exception des températures dépassant 30° C, la diminution de longévité se traduit presque uniquement par l'augmentation de la pente.

Pour une souche donnée, la longévité est plus grande lorsque les cultures sont effectuées à l'obscurité que lorsqu'elles sont maintenues en lumière continue. La variation porte principalement sur la dispersion des longévités individuelles, c'est-à-dire, comme dans le cas précédent, sur la pente de la droite.

Quand une souche est entretenue par repiquages successifs, sa longévité est d'autant plus courte que la taille des semis utilisés est plus faible, le maximum de longévité correspondant à l'absence de repiquage. La variation intéresse, dans ces cas, les deux paramètres, mais c'est ici le palier qui subit les variations les plus importantes. Lorsqu'on utilise des semis de taille homogène, la longévité est d'autant plus courte que les repiquages sont plus fréquents. Le maximum de longévité correspond là encore à l'absence de repiquage ; le minimum de longévité se traduit par une diminution simultanée de la longueur du palier et de la dispersion des longévités individuelles. Ces deux techniques conduisent l'une et l'autre à une croissance discontinue avec périodes de latence au cours desquelles les filaments emportés par les semis subissent des remaniements internes profonds et des régénérations nombreuses. C'est dans une situation très voisine de celle-ci que nous rencontrerons bientôt (chap. III) une accélération manifeste de la période d'incubation.

Si l'on compare les courbes de longévité de différentes souches cultivées dans des conditions homogènes, on constate qu'il existe une corrélation entre la longueur du palier et la pente de la droite qui lui fait suite. Ceci est particulièrement net sur la figure 5 relative à différentes races, et sur la figure 13 concernant l'influence du couple + /—. Si l'on compare maintenant les courbes correspondant à une même souche cultivée dans des milieux différents, on constate qu'un changement de milieu fait varier les deux paramètres dans le même sens : à une augmentation sensible de la longueur du palier correspond généralement une diminution décelable de la pente de la droite. Toutefois, ces variations corrélatives ne paraissent pas toujours répondre à une loi simple. Ainsi, la taille des semis influe beaucoup plus sur la longueur du palier que sur la pente de la droite (voir fig. 15, p. 694), alors que les variations d'éclairement se répercutent bien davantage sur la pente de la droite que sur la longueur du palier (voir fig. 12, p. 689). Dans le cas de la température, les phénomènes sont encore plus complexes : entre 16° C et 28° C, les variations portent presque uniquement sur la

pente (voir fig. 11, p. 687) ; à des températures plus élevées, le palier et la pente subissent l'un et l'autre des variations importantes.

On a vu au chapitre I que l'apparition du déterminant efficace de la sénescence est suivie d'une phase d'incubation. Dans le cas de l'hypothèse formulée (courbe à un coup), le palier de chacune des courbes correspondrait exactement à cette phase. Dans le cas d'une courbe à plusieurs coups, au contraire, seule une fraction du palier correspondrait à la période d'incubation ; l'autre fraction dépendrait du nombre des coups et de leur fréquence : elle devrait donc varier en même temps que la pente des droites. Or, si on examine en particulier la figure 11 (p. 687), on remarque qu'une variation énorme de la pente n'entraîne pratiquement aucune variation de la longueur du palier. Ainsi, on trouve là une confirmation de l'hypothèse faite au chapitre I : l'apparition du déterminant de la sénescence résulte d'un événement unique ayant une certaine fréquence d'apparition ; la période d'incubation correspond à l'évolution de ce déterminant. Certains facteurs paraissent influer davantage sur la probabilité d'apparition que sur l'évolution du déterminant ; d'autres, au contraire, paraissent influer davantage sur le déroulement de la phase d'incubation.

Il existe manifestement une corrélation entre la fréquence d'apparition du déterminant et la durée de son évolution. Si l'on en juge par les modalités d'action d'un certain nombre de facteurs, il n'en est pas moins vrai que chacun de ces paramètres présente une autonomie partielle certaine.

CHAPITRE III

LA LOCALISATION CYTOPLASMIQUE DU DÉTERMINANT DE LA SÉNESCENCE

L'étude des courbes de longévité et des modalités de leur variation nous a conduits à proposer une explication du mécanisme d'apparition de la sénescence. Nous n'avons pas encore abordé le problème de sa nature au niveau cellulaire et de la localisation du déterminant responsable dont l'existence a déjà été postulée. Très tôt, cependant, des observations variées ont suggéré que le caractère sénescent ne correspondait pas à une variation de type banal.

L'existence d'une période d'incubation peut être comparée à l'évolution de certaines maladies à virus. Par ailleurs, dans les expériences faites à partir de cultures en longs tubes où des semis sont prélevés tardivement en arrière du front de sénescence, plusieurs anomalies se manifestent. Les thalles issus de ces semis, prélevés dans la zone correspondant à la période d'incubation, ont une longévité inférieure à la distance qui sépare le lieu de leur prélèvement de l'extrémité sénescente ; si l'on utilise le même semis à plusieurs reprises, les thalles successifs qui en résultent ont des longévités de plus en plus courtes ; dans le cas des souches A, les semis prélevés à 10 et même 15 cm en arrière du front de sénescence, c'est-à-dire bien avant le début de la période d'incubation, conduisent néanmoins à des mycéliums contenant le déterminant dès le début de leur croissance. Des expériences du même genre, faites avec des souches de l'*Ascobolus stercorarius*, dont la longévité est très grande, donnent des résultats encore plus nets : en effet, les semis prélevés à 30 cm et même plus en arrière du front de sénescence conduisent dans tous les cas à des cultures immédiatement sénescentes. Lorsque le front de croissance occupait ces régions, la période d'incubation n'était manifestement pas amorcée et aucune observation ne permet de penser que le déterminant de la sénescence apparaît dans les filaments âgés. Dans ces conditions, tout se passe comme si ce déterminant remontait le long des filaments et l'ensemble de ces faits suggère que le caractère sénescent pourrait être infectieux.

On sait par ailleurs que, chez le *Podospora anserina*, une autre anomalie de croissance, présentant avec la sénescence un certain nombre d'analogies, se transmet au cours de la reproduction sexuelle selon un schéma non mendélien (Rizet, 1942 *b*).

Ces diverses indications nous ont incités, d'une part, à rechercher le mode de transmission du caractère sénescent et, d'autre part, à essayer de démontrer expérimentalement que ce caractère est réellement infectant, comme le suggèrent les faits que nous venons de rapporter.

1° L'hérédité maternelle de la sénescence.

L'utilisation de souches autofertiles a montré que les mycéliums déjà visiblement sénescents conservent leur aptitude à fructifier. Lorsqu'on confronte deux souches sénescentes de signes contraires ou qu'on spermatise l'une par les microconidies de l'autre, on aboutit également à une culture fertile. Par ailleurs, nous avons vérifié à de multiples reprises que des thalles qui n'ont pas encore atteint la phase d'incubation restent en cet état lorsqu'on les conserve au réfrigérateur (température de 3° C environ).

Dans ces conditions, il est possible d'étudier au même moment, dans des conditions homogènes, à partir d'une souche + et d'une souche — données, les huit croisements suivants : ♀ + *jeune* × ♂ — *jeune* et réciproquement ; ♀ + *sénescente* × ♂ — *sénescent* et réciproquement ; ♀ *sénescente* × ♂ *jeune* et ♀ *jeune* × ♂ *sénescent*, la femelle pouvant être la souche + ou la souche —.

Les résultats essentiels de ces expériences ont été décrits à plusieurs reprises (Rizet et Marcou, 1954 ; Rizet, 1957). On peut les résumer de la manière suivante : 1° le caractère sénescent est transmissible par la reproduction sexuelle ; 2° il ne se transmet jamais par les éléments mâles (microconidies) ; 3° il se transmet dans tous les croisements où la souche utilisée comme mère est sénescente ; certaines des ascospores issues de ces croisements fournissent des thalles chez lesquels la sénescence apparaît très tôt et on doit admettre que la phase d'incubation était déjà amorcée dans l'ascospore ; 4° la sénescence ne se rencontre que dans certains périthèces dont la quasi-totalité des spores conduisent à des souches à longévité réduite ou très réduite ; les autres périthèces ne contiennent que des spores saines ; 5° selon les souches utilisées, la fréquence de ces deux sortes de fructifications varie dans une large mesure (dans le cas des souches S testées à ce sujet, la fréquence des périthèces sénescents est faible : de l'ordre de 10 p. 100 ; dans le cas des souches A, cette fréquence est, au contraire, très élevée : de l'ordre de 90 p. 100) ; les souches S ont une longévité bien supérieure à celle des souches A (voir tableau I, p. 672) ; on peut donc penser qu'il y a une relation entre la longévité d'une souche et la fréquence des « périthèces sénescents » qu'elle peut produire ; par contre, rien n'indique que, pour une souche donnée, cette fréquence dépende du stade de la période d'incubation auquel on réalise les spermatisations ; 6° tous les descendants des fructifications « sénescentes » ne sont pas

affectés au même degré; certaines ascospores ne germent pas; d'autres donnent naissance à des filaments immédiatement sénescents ou ne manifestant qu'une longévité réduite ; enfin il arrive, mais très rarement, que des ascospores issues de tels périthèces conduisent à des souches normales; 7° il existe une corrélation certaine entre les degrés de sénescence des ascospores d'un même périthèce ; cette corrélation est encore beaucoup plus nette pour les quatre souches issues des quatre ascospores d'un même asque.

Nous avons refait à diverses reprises des expériences du même type que celles dont nous venons de résumer les résultats. Nous avons utilisé des souches S et A comme précédemment et également des souches D. Les souches D se comportent comme les souches S déjà décrites : lorsque la mère est sénescente, les périthèces aberrants existent mais sont rares. En ce qui concerne les souches S et A, on retrouve le plus souvent les résultats déjà connus. Toutefois, dans certains des croisement réalisés, à côté des deux sortes de fructifications définies plus haut, nous avons observé des périthèces mixtes contenant à la fois des asques qui fournissent des souches sénescentes et des asques qui conduisent à des souches de longévité normale. Il arrive que ces périthèces hétérogènes soient assez nombreux : dans le cas du croisement ♀ S 93 *sénescente* × ♂ S 15 *jeune*, les trois types de fructifications ont des fréquences sensiblement égales. Le même croisement a permis de déceler une autre anomalie. Nous avons déjà mentionné la corrélation très étroite entre les longévités des quatre souches issues des quatre spores d'un même asque ; dans quelques rares cas, cette règle n'est pas respectée ; on obtient, par exemple, à partir du même asque une souche sénescente et trois souches normales ou, au contraire, trois souches à longévité presque nulle et une souche à longévité presque normale.

Les résultats concernant la souche S 93 (croisement ♀ S 93 *sénescente* × ♂ S 15 *jeune*) sont les seuls qui ne s'accordent pas avec la relation formulée plus haut entre la longévité d'une souche et la fréquence des fructifications sénescentes. Les souches D sont à longévité relativement élevée (tableau I, p. 672), comme les souches S, et, comme la plupart de celles-ci, donnent très peu de fructifications aberrantes.

2° *Caractère contagieux de la sénescence.*

Les observations que nous venons de rapporter, en particulier l'absence de ségrégation dans les « asques sénescents », suggèrent que le déterminant de la sénescence pourrait être cytoplasmique. D'autres faits signalés plus haut conduisant à penser que l'état sénescent est infectieux, nous nous sommes alors demandé si ces caractéristiques du déterminant de la sénescence ne pouvaient pas être établies d'une manière plus directe et

plus probante en effectuant des greffes entre filaments sains et filaments sénescents et en observant les modifications qui en résultent.

Les expériences de microchirurgie réalisées dans le cas des souches s et s^s du même Champignon ont montré qu'il est possible d'expérimenter sur des hyphes isolées, de les placer en chambre à huile de telle sorte qu'elles s'anastomosent et d'observer les échanges qui se produisent par cette voie. Ces expériences ont montré également, grâce à l'utilisation de souches marquées génétiquement, que les échanges se limitent au cytoplasme : au moins dans les souches utilisées, les noyaux ne franchissent jamais les cloisons de l'article mixte obtenu (Schecroun, 1958).

Nous avons utilisé les mêmes techniques pour réaliser des greffes entre hyphes individuelles normales et sénescentes, et des expériences préliminaires nous ont montré que, dans ce cas, les anastomoses se produisent aussi facilement qu'entre deux hyphes saines.

Dans une première série de manipulations, nous avons recherché si des échanges se produisent réellement entre ces deux sortes d'hyphes. Les hyphes saines utilisées proviennent d'une souche + portant le gène *i*, les hyphes sénescentes, d'une souche — portant l'allèle *I* de *i*. Les deux filaments sont placés dans une même microgoutte de milieu nutritif, en chambre à huile, et mis en contact à l'aide d'une micro-aiguille. Les anastomoses qui se forment habituellement au bout de quelques heures sont observées au microscope et on peut déterminer, à une heure près, le moment où la communication s'établit entre les hyphes. Des expériences témoins sont réalisées en même temps et dans les mêmes conditions entre deux hyphes saines issues des deux mêmes souches.

Les deux hyphes dont la croissance se poursuit (surtout dans le cas de l'hyphe saine) sont laissées en communication pendant au moins une dizaine d'heures, puis on sectionne l'anastomose à l'aide d'un microscalpel pour séparer les deux participants. Chacun d'eux est alors placé dans une nouvelle microgoutte où il constitue au bout de douze heures environ une microculture de taille suffisante pour être transportée sans dommage sur moût de maïs gélosé en boîte de Pétri. Dans certains cas, sur ce nouveau milieu, la croissance se poursuit suffisamment pour que l'on puisse déceler si les thalles sont de phénotype I ou i, s'ils sont autofertiles ou autostériles et, dans ce dernier cas, déterminer leur signe.

De telles expériences ont toujours donné des résultats homogènes qu'on peut résumer de la manière suivante : 1° chaque fois qu'il est possible de tester le génotype d'un thalle, ce génotype est identique à celui du filament primitif ; l'anastomose n'est donc pas suivie de migration nucléaire ; 2° les thalles issus des filaments de contrôle sont à longévité normale ; aucune anomalie de longévité n'est donc consécutive aux traumatismes

résultant des manipulations ; 3° les thalles issus des filaments originellement sénescents sont également sénescents ; leur croissance n'est pas différente de celle des filaments sénescents n'ayant subi aucune anastomose et cultivés dans les mêmes conditions ; 4° les thalles issus de filaments sains

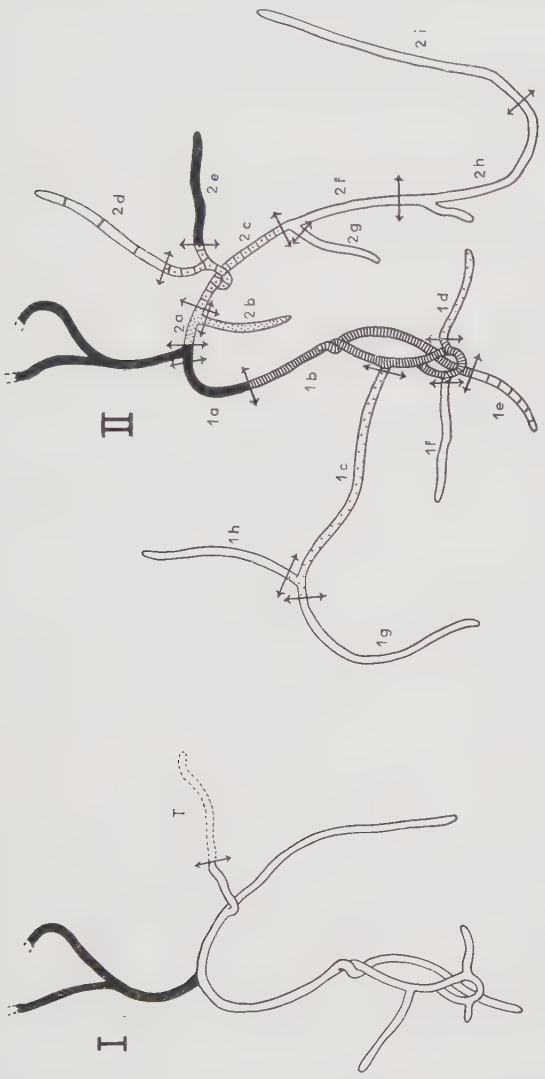


Fig. 16. — Résultats de l'infection d'un filament normal par un filament sénescent à la suite d'une anastomose. I. État du microthalle immédiatement après la réalisation de l'anastomose. II. État du microthalle au moment où les filaments ont été fragmentés au micromanipulateur. Les caractères des cultures obtenues à partir de chacun des fragments sont indiqués par des symboles particuliers. La largeur des hyphes a été fortement exagérée, afin d'y inscrire ces symboles.

anastomosés pendant un certain temps à des filaments sénescents montrent tous une longévité diminuée, parfois très réduite et toujours très inférieure à la période d'incubation de la souche correspondante.

Il se produit donc régulièrement des échanges au niveau des anastomoses. Ces échanges ne peuvent être que d'ordre cytoplasmique. Ils se produisent

seulement du filament sénescent vers le filament sain et celui-ci est l'objet d'une véritable contamination. L'échange qui se produit amorce un phénomène qui se généralise à toute la culture issue de l'hyphe saine primitive et dont la croissance peut correspondre à une augmentation de masse considérable. Cette évolution se fait alors que le contact avec le filament primitif sénescent est rompu. Il y a non seulement invasion de l'ensemble du thalle, mais aggravation du caractère sénescent au cours du temps, comme dans les cas de sénescence spontanée. Il ne peut indubitablement pas s'agir d'une simple diffusion.

Il est difficile de suivre le cheminement de l'infection sur un mycélium entier dont la structure est très complexe. Mais on doit pouvoir suivre, dans une expérience comme celle que nous venons de décrire, les modalités de l'invasion d'un filament sain.

La figure 16 représente l'une des expériences réalisées à cet effet. Comme précédemment, on a provoqué la formation d'une anastomose entre un filament sénescent et un filament sain (fig. 16, I) ; une communication s'est alors établie entre les deux filaments ; le filament sain a poursuivi sa croissance, s'est ramifié et, au bout de douze à treize heures, a constitué le microthalle représenté par la figure 16, II. A ce moment, non seulement on a sectionné l'anastomose, mais on a fragmenté la microculture en 17 morceaux de 100 à 150 microns de long (fig. 16, II) dont on a noté les positions relatives et qu'on a isolés dans de nouvelles microgouttes. Certains d'entre eux n'ont montré aucune croissance ; d'autres ont fait l'objet d'un allongement très faible, mais la plupart ont conduit à des microcultures d'apparence normale. Ces dernières, avant d'être transportées sur moût de maïs gélosé, ont été divisées en trois fractions qui ont conduit à trois lignées parallèles dont les longévités ont été déterminées.

Dans le cas de l'expérience représentée par la figure 16, les trois lignées parallèles de même origine ont toujours montré des longévités strictement identiques : nous n'avons donc mentionné pour chaque fragment qu'une seule longévité. Ces longévités, selon leur importance, sont représentées sur l'image II de cette figure par des symboles différents.

Les divers fragments conduisent à des cultures de longévités très diverses. D'une manière générale, ces longévités sont d'autant plus courtes que les fragments correspondants sont prélevés plus près du point d'anastomose. Ainsi, pour la branche 1 du microthalle, le fragment 1_a ne montre aucune croissance, les fragments 1_b, 1_c, 1_d et 1_e conduisent à des longévités faibles mais de valeurs croissantes ; enfin, les fragments 1_f, 1_g et 1_h ont fourni des lignées dont les longévités ne diffèrent pas statistiquement de celles des hyphes témoins. Ainsi, les fragments les plus éloignés du point d'anastomose semblent ne pas contenir le déterminant de la sénescence alors que les autres, au fur et à mesure que l'on se rapproche du point d'anastomose,

traduisent les phases successives de la période d'incubation. Un gradient analogue, mais non identique, a été mis en évidence dans la branche 2 du même microthalle (fig. 16, II ; fragments 2_a, 2_b, 2_c, 2_d, 2_e, etc.).

Il existe cependant des exceptions à la règle précédente dont l'une nous est fournie par le devenir du fragment 2_c. Ce fragment résulte de la régénération d'une extrémité d'hyphe sectionnée antérieurement pour servir de témoin (voir fig. 16, I). On constate que sa croissance s'arrête presque immédiatement, beaucoup plus tôt que celle des fragments prélevés plus près du point d'anastomose. Dans tous les cas où une telle constatation a été faite, il s'agissait de fragment venant de subir une régénération.

Nous avons réalisé une douzaine d'expériences du type de celle que nous venons de décrire : toutes ont conduit à des résultats analogues, mais avec des modalités dont certaines méritent d'être relevées. Lorsqu'un fragment est prélevé loin du point d'anastomose, il arrive que les trois lignées qu'il permet d'obtenir (voir plus haut) n'aient pas la même longévité ; en particulier, l'une d'elles peut avoir une longévité normale, alors que les deux autres sont dès l'origine en phase d'incubation. Lorsque deux fragments sont prélevés à égale distance du point d'anastomose, ils conduisent parfois à des lignées de longévités très dissemblables. C'est surtout vrai lorsque ces fragments correspondent à des portions d'hyphes qui se sont allongées et ramifiées très inégalement postérieurement à l'anastomose : les lignées issues de fragments prélevés dans une zone à croissance rapide ou à ramification intense ont toujours, à situation égale, une longévité beaucoup plus courte. Le minimum de longévité est atteint par les fragments issus de régénération comme le fragment 2_c cité plus haut. Le maximum est obtenu pour les fragments qui n'ont montré aucune croissance postérieurement à l'anastomose. Dans ce dernier cas, il arrive même que l'une des branches du filament sain anastomosé ne soit pas contaminée.

Dans les expériences qui viennent d'être décrites, la suppression du contact entre hyphes saines et sénescentes et la fragmentation ont été effectuées au bout de temps variés : de quatre heures à plus de vingt-quatre heures. Fréquemment, après quatre heures de contact, seul le premier fragment est contaminé ; même après vingt-quatre heures, comme dans l'expérience correspondant à la figure 16, la contamination n'atteint jamais l'extrémité la plus éloignée du point d'anastomose. La vitesse de contamination est donc faible et, en particulier, beaucoup plus faible que celle relevée chez le même organisme pour un autre caractère cytoplasmique : le caractère s (Schecroun, 1958).

3° Conclusions.

Deux aspects importants et nouveaux se dégagent des expériences rapportées au cours de ce chapitre : la possibilité de transmission de l'état

sénescent au cours de la reproduction sexuelle et la possibilité de contaminer un filament sain par un filament sénescent par anastomose.

1° ***La transmission de l'état sénescent au cours de la reproduction sexuelle.*** — Cette transmission revêt deux modalités importantes. Le caractère sénescent se transmet uniquement par la mère, c'est-à-dire par l'intermédiaire de l'ascogone ; dans ce cas, il est habituellement généralisé à tous les asques d'un même périthèce et à toutes les souches (habituellement quatre) issues des ascospores d'un même asque ; il ne fait donc l'objet d'aucune ségrégation de type mendélien. Mais ce caractère ne se transmet qu'à une fraction de la descendance, certains périthèces ne le transmettant pas : la fréquence de ceux-ci dépend de la souche utilisée comme mère et est apparemment d'autant plus faible que la longévité moyenne de cette souche est plus grande.

Chez le *Podospora anserina*, on sait qu'à l'origine de chaque périthèce il y a un unique couple de noyaux de signes contraires (Rizet, 1943) et que très probablement le cytoplasme de ce « dicaryon » est d'origine uniquement maternelle. Les faits rapportés conduisent donc à penser que certains de ces dicaryons contiennent le déterminant de la sénescence, alors que les autres ou ne le contiennent pas, ou se « décontaminent » au cours du développement du périthèce.

2° ***La possibilité d'infecter un filament sain par un filament sénescent.*** — Lorsqu'on réalise par anastomose une communication protoplasmique entre une hyphe sénescente et une hyphe saine, il y a passage dans celle-ci du déterminant de la sénescence. Au cours de ce transfert, aucune migration nucléaire ne se produit. Une fois cette infection amorcée, elle se généralise à l'ensemble du thalle formé à partir de cette hyphe avec des modalités tout à fait superposables à celles qui caractérisent la période d'incubation. On retrouve donc ici un phénomène comparable à celui du transfert chez le même organisme du caractère s aux souches s^s.

Ainsi, les résultats obtenus à la suite des anastomoses s'ajoutent à ceux fournis par les croisements entre souches sénescentes et souches normales (existence de deux types de fructifications, transmission uniquement maternelle, absence de ségrégation dans les asques) pour imposer l'idée que le déterminant de la sénescence est de nature cytoplasmique. Ce déterminant serait absent dans les souches saines, présent dans les souches sénescentes et l'infection résulterait de son passage des souches sénescentes vers les souches saines.

Les modalités de cette infection et les manifestations qu'elle déclenche méritent d'être regroupées à la suite de l'ensemble des observations faites. Elle débute par une diffusion du déterminant dans l'hyphe saine ; elle est relativement lente ; elle revêt un aspect quantitatif, la concentration paraissant d'autant plus faible que l'on s'éloigne davantage du point d'anasto-

mose. Cette gradation n'est pas décelable directement : elle est mise en évidence parce qu'elle déclenche un phénomène qui se propage et s'aggrave au cours de la croissance des thalles issus de chaque fragment d'hyphe contaminé ; ces thalles ont des longévités parfois nulles, toujours réduites et d'autant plus réduites que les fragments sont prélevés plus près du point d'anastomose.

Les hyphes jeunes à croissance et à ramification rapides s'infectent très facilement, alors que l'infection, si l'on en juge par des faits rapportés au premier chapitre (p. 676), ne « remonte » pas ou « remonte » très difficilement dans les hyphes plus âgées. Il y a peut-être là une propriété particulière du *Podospora anserina* puisque, chez l'*Ascobolus stercorarius* (voir p. 699), chez le *Pestalozzia annulata* (Chevaugeon et Digbeu, 1960) et chez l'*Aspergillus glaucus* (Sharpe, 1958; Jinks, 1959), le caractère âgé d'une hyphe ne s'oppose pas à sa contamination.

A la suite d'anastomose entre hyphe saine et hyphe sénescente, les fragments les moins contaminés fournissent des thalles qui, après fractionnement, donnent naissance à des lignées dont certaines ne sont pas atteintes. On peut imaginer que la diffusion a conduit à une répartition hétérogène du déterminant ou que la concentration de celui-ci est insuffisante pour déclencher obligatoirement, dans toutes les régions du thalle, le processus d'évolution du phénomène.

En dehors de la nature cytoplasmique du déterminant de la sénescence, du caractère infectieux de ce déterminant, les diverses observations rapportées posent le même problème fondamental que celui déjà rencontré lors de l'étude de la période d'incubation (chapitre I). Lorsque le déterminant de la sénescence est présent dans un élément mycélien, celui-ci conduit à un thalle qui évolue d'autant plus rapidement vers la sénescence visible que l'infection originelle était plus massive. Que la présence du déterminant soit la conséquence d'un événement spontané ou d'une infection provoquée, cette évolution présente toujours les mêmes caractéristiques : l'anomalie s'aggrave progressivement et continuellement au cours de la croissance. Dans un thalle contaminé, les hyphes sont d'autant plus atteintes qu'elles sont de formation plus récente, le terme du phénomène étant constitué par l'arrêt total de la croissance et fréquemment par la mort de l'extrémité des hyphes.

CHAPITRE IV

LA RÉVERSIBILITÉ DE LA SÉNESCENCE

Les faits rapportés au cours des chapitres précédents ont montré que la croissance d'une souche homocaryotique du *Podospora* se décomposait en deux phases, le passage d'une phase à l'autre correspondant à l'apparition du déterminant de la sénescence. Au cours de la première phase, le caractère « normal » du mycélium se transmet par hérédité cellulaire. Le caractère sénescent de la seconde phase se maintient de la même manière : toutefois, il s'aggrave d'une manière continue au cours de la croissance, cette évolution se traduisant au bout d'un certain temps par l'apparition d'un mycélium anormal et, enfin, par l'arrêt total de l'allongement des filaments. Pour rendre compte du passage d'une phase à l'autre, il n'est pas nécessaire de faire appel à une modification du génotype.

Des situations analogues sont connues chez d'autres Végétaux. Dans ces cas, pour désigner les phases successives, on parle parfois de « forme de jeunesse » et de « forme adulte ». Le passage d'un état à l'autre se présente habituellement comme une véritable métamorphose sans stade intermédiaire. Dans certains cas, en milieu homogène, le changement apparaît au bout de temps très variables : c'est ce qu'on observe chez certains Champignons (Sharpe, 1958 ; Jinks, 1959 ; Chevaugeon et Lefort, 1960 ; Chevaugeon et Digbeu, 1960 ; Cuzin, 1961). Chez beaucoup de Phanérogames où se développent, comme chez les *Coffea*, des rameaux plagiotropes, ceux-ci correspondent au devenir normal de certains bourgeons ; dès que ces bourgeons sont formés, l'apparition de la deuxième phase est donc entièrement déterminée. Cette situation ne s'oppose pas forcément aux précédentes, l'apparition même des bourgeons pouvant correspondre, comme l'apparition du déterminant de la sénescence, à un événement aléatoire.

Chez les Végétaux supérieurs montrant deux phases (« forme de jeunesse » et « forme adulte ») ou deux types de rameaux (orthotropes et plagiotropes), les organes sexuels se développent habituellement sur les rameaux les plus évolués (forme adulte ou rameaux plagiotropes) ; mais les graines donnent toujours naissance à des individus se présentant sous la forme la moins évoluée (forme de jeunesse ou tiges orthotropes).

On sait que des mécanismes autres que la reproduction sexuelle peuvent conduire à des résultats analogues. Ainsi, chez les *Citrus* (Frost, 1938,

1952 ; Frost, Cameron et Soost, 1957 ; Cameron et Soost, 1952, 1955), la reproduction apogamique fournit des individus différents, au moins au départ, des individus adultes. Chez plusieurs Champignons, des spores asexuelles semées isolément produisent des thalles moins « différenciés » que celui qui les a produites : toutefois, si ce « rajeunissement » peut être général (Chevaugeon et Digbeu, 1960), il ne porte parfois que sur une fraction des spores (Sharpe, 1958 ; Chevaugeon et Digbeu, *loc. cit.*) et peut même ne pas se produire (Jinks, 1957, 1958). Le *Podospora anserina* présente à ce sujet une particularité tout à fait remarquable puisque, comme nous l'avons vu au chapitre précédent, la reproduction sexuelle elle-même peut être inefficace pour faire disparaître le déterminant de la sénescence. Nous avons vu, en effet, que les croisements impliquant une souche mère sénescente fournissent deux sortes de périthèces en proportion variable selon les souches : les uns dont toutes les ascospores conduisent à des souches normales (c'est-à-dire en « phase de jeunesse »), les autres dont toutes les spores germent en donnant des thalles aberrants (c'est-à-dire sénescents dès leur naissance). Dans les souches S, les périthèces du premier type représentent plus de 90 p. 100, alors que dans un thalle sénescent nous verrons bientôt que la quasi-totalité des filaments semés isolément demeurent sénescents. Il paraît donc difficile d'admettre que ces périthèces résultent d'ascogones dépourvus de déterminant; il est beaucoup plus plausible de supposer qu'un véritable rajeunissement s'opère au cours de leur développement. L'existence des périthèces du deuxième type montre que ce mécanisme n'est pas toujours efficace. Cela peut laisser des doutes sur le rôle de la reproduction sexuelle elle-même et nous inviter à rechercher si des résultats analogues ne peuvent pas être obtenus sans avoir recours à celle-ci.

Une observation fortuite à l'origine confirme le bien-fondé de cette suggestion : les modifications consécutives au maintien de souches sénescentes à basse température. D'autres résultats proviennent d'essais effectués en vue de connaître la structure d'un mycélium sénescent au niveau des filaments ou des articles individuels, c'est-à-dire au niveau cellulaire.

1° La possibilité du rajeunissement global d'un thalle sénescent.

On savait déjà qu'une souche jeune conservée au réfrigérateur ne vieillissait pas : remise à température normale, elle pouvait être le point de départ de lignées jumelles nombreuses qui permettaient d'établir une courbe de longévité superposable à celle obtenue avec la même souche étudiée dès la germination de l'ascospore. Nous nous sommes alors demandé si le maintien à basse température (3° C environ) pouvait également influer sur la phase d'incubation en bloquant son évolution. Nous avons constaté que non seulement il en était bien ainsi, mais que, très rapidement, après un séjour au froid d'une dizaine de jours, le thalle replacé dans les conditions habituelles

de culture (26-27° C) montrait une longévité accrue. Cette observation a été refaite à de multiples reprises et l'accroissement de longévité est encore plus net quand le séjour à basse température est de plus longue durée. Il apparaît donc que, dans ces conditions, les thalles en période d'incubation ou même visiblement sénescents subissent un véritable rajeunissement.

Après avoir fait une analyse expérimentale de cette action du froid, nous nous sommes demandé si d'autres facteurs qui déterminent également un arrêt presque total de la croissance ne conduiraient pas au même résultat. Parmi les facteurs étudiés, citons la dessiccation des mycéliums en atmosphère normale ou sous vide, le maintien des thalles sénescents sous huile, dans de l'eau distillée, sur un milieu sans Mn et à *p*H inférieur à 6 (Tavlitzki, 1954), sous atmosphère d'azote. L'action de certains de ces traitements est analogue à celle des basses températures. Les températures élevées (36° C) déterminent elles aussi un rajeunissement, mais nous verrons qu'il ne s'agit que d'une « guérison » très provisoire.

Nous nous sommes ensuite demandé si le rajeunissement, quel que soit le facteur utilisé pour le provoquer, pouvait être obtenu à plusieurs reprises sur une même lignée. Nous avons recherché si les « facteurs de rajeunissement » agissaient aussi efficacement sur les thalles « sénescents de naissance » que sur les thalles sénescents résultant d'une évolution normale. Aucun des traitements reconnus efficaces ne provoque un arrêt total de l'allongement des filaments : de telles expériences ne permettent donc pas de savoir si un rajeunissement est possible en l'absence de croissance. Nous avons essayé de surmonter cette difficulté en traitant des « ascospores sénescentes » avant leur germination.

1° ***Le rajeunissement consécutif à l'action de basses températures.*** — S'il est facile de vérifier que les basses températures rajeunissent les thalles déjà visiblement sénescents, il est plus difficile de vérifier l'action de ce même facteur aux stades invisibles de la période d'incubation puisque ceux-ci ne sont décelés qu'*a posteriori*. On peut assez simplement pallier cet inconvénient. Si, pour une souche homocaryotique donnée, on entretient un certain nombre de lignées parallèles, au moment où les premières de ces lignées atteignent la phase de sénescence visible, beaucoup d'autres ont déjà atteint la période d'incubation et se situent à des stades variés de l'évolution du déterminant. Pour déceler ces lignées et les stades auxquels elles se trouvent, il est nécessaire d'étudier leur évolution ultérieure. Ce problème ne présente pas de difficulté majeure : comme chaque lignée se présente sous forme d'une culture en tube, au moment choisi il suffit de réaliser deux cultures à partir d'un même tube ; l'une sera mise rapidement au réfrigérateur, l'autre poursuivra sa croissance dans des conditions normales. Selon le moment où cette dernière culture deviendra visiblement sénescente, on en conclura que sa jumelle avait atteint ou non la période d'incubation au moment de sa mise à basse température et on connaîtra ainsi le stade où elle se trouvait. Sur la culture traitée, on pourra prélever des semis au bout de temps variés de séjour au froid, étudier la croissance des

cultures issues de ces semis successifs et comparer la longévité des thalles ainsi obtenus à celle de la culture qui n'a subi aucun traitement. Ces comparaisons sont évidemment plus faciles dans le cas des thalles qui se trouvaient à des stades avancés de la période d'incubation au moment de leur mise à basse température, car il sera sans doute difficile de distinguer les thalles non encore atteints de ceux chez lesquels le déterminant venait d'apparaître. On peut surmonter dans une certaine mesure cette dernière difficulté en partant d'un très grand nombre de lignées parallèles. On peut alors non seulement étudier l'action du froid sur de nombreuses lignées individuelles, mais également construire, pour les divers temps de traitement, des courbes de longévité (ou plus exactement des courbes d'apparition du mycélium aberrant), que l'on peut comparer entre elles et à la courbe témoin correspondant à la souche.

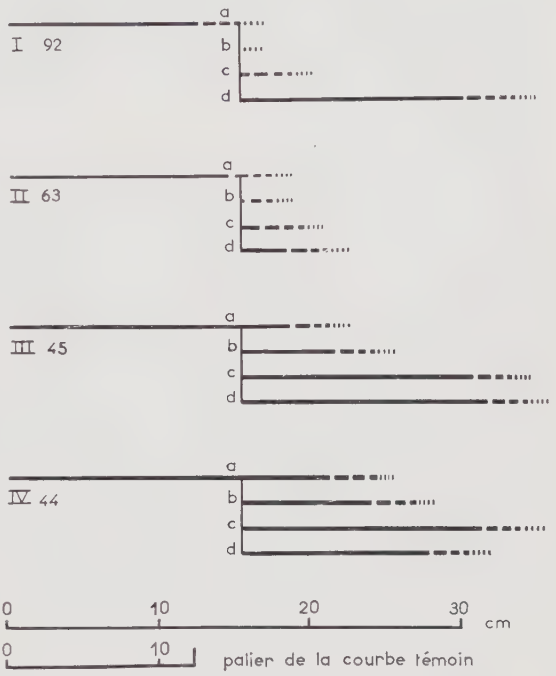


FIG. 17. — Représentation schématique des longévités de quatre lignées parallèles de la souche S 173 : 92, 63, 45 et 44. *a* : longévités témoins de ces lignées; *b*, *c*, *d* : longévités de ces mêmes lignées après dix jours, vingt jours et quatre mois de séjour au froid. Les traits verticaux indiquent le moment auquel le traitement a été effectué. L'échelle placée au bas de la figure permet de mesurer les longévités observées. On a représenté également la longueur du palier de la souche. Une ligne continue symbolise un mycélium d'apparence saine, une ligne discontinue un mycélium d'apparence malade, les degrés croissants de sénescence étant marqués par des tirets de plus en plus courts.

Les expériences de ce type ayant toujours donné des résultats homogènes, nous nous bornerons à résumer ici les faits concernant la souche S 173 dont nous avons suivi 120 lignées jumelles après dix jours, vingt jours et quatre mois de séjour au froid. La figure 17 schématise les résultats concernant le rajeunissement individuel de certaines lignées ; la figure 18, le rajeunissement correspondant à l'ensemble des lignées après les divers temps de séjour au froid.

La figure 17 concerne le devenir des lignées 92, 63, 45 et 44, soit en l'absence de traitement (fig. 17 *a*), soit après les divers temps de traitement (fig. 17 *b*, *c* et *d*).

La lignée 92 manifeste une période de croissance normale égale au palier de la courbe de longévité de la souche S 173 (I, *a*). Il s'agit donc d'une des premières lignées qui aient manifesté des signes de sénescence et elle a été mise au froid alors que sa croissance était presque arrêtée. Un séjour de dix jours à 3° C du thalle sénescent n'a apporté aucune modification décelable (I, *b*). Après vingt jours, la croissance a repris, mais s'est arrêtée presque immédiatement (I, *c*). Après quatre mois au contraire, on a obtenu un thalle normal qui n'a manifesté des signes de sénescence qu'après une croissance considérable (I, *d*) ; cette croissance dépasse même la longévité minimum observée pour la souche S 173 (palier de la courbe de longévité de cette souche).

Au moment du traitement, la lignée 63 était sensiblement au même stade que la lignée 92 et elle s'est comportée sensiblement de la même façon après dix et vingt jours de traitement (II, *b* et II, *c*). Un séjour de quatre mois a conduit à un rajeunissement net, mais celui-ci ne s'est pas montré durable (II, *d*). Dans le cas de la lignée 92, on peut penser qu'après quatre mois le déterminant de la sénescence a été éliminé, mais, dans le cas de la lignée 63, le mycélium est resté manifestement dans la phase d'incubation : on observe seulement une régression dans le stade atteint au moment du traitement.

Dans le cas des lignées 45 et 44, le traitement a été appliqué au moment où les thalles paraissaient encore normaux, mais se trouvaient en réalité en phase d'incubation (III, *a* et IV, *a*). Dans ces cas, tous les traitements, quelle que soit leur durée, se sont révélés efficaces. Toutefois, alors qu'au bout de dix jours de séjour au froid on observe seulement une régression de la phase d'incubation (III, *b* et IV, *b*), il apparaît que les traitements plus prolongés conduisent à un rajeunissement total (III, *c* ; III, *d* ; IV, *c* et IV, *d*).

Les résultats concernant la totalité des lignées ayant déjà atteint ou étant très proches de la période de sénescence visible au moment du traitement rentrent tous dans le cadre de ceux que nous venons de décrire. Les rajeunissements sont fréquents et d'autant plus fréquents et considérables que le traitement est plus prolongé. S'il s'applique à des thalles déjà visiblement sénescents, des résultats très nets ne sont observés qu'après quatre mois de séjour à basse température et, même dans ce cas, les résultats sont irréguliers ; il ne s'agit fréquemment que d'un retour à un stade plus précoce de l'évolution du déterminant. Au contraire, si les thalles traités, tout en ayant déjà atteint la période d'incubation, ne sont pas encore arrivés au stade de la sénescence visible, l'action du froid est efficace dans la quasi-totalité des cas ; si le traitement a duré vingt jours ou plus, on observe le plus souvent un rajeunissement tel qu'on peut penser que le déterminant a été totalement éliminé.

La figure 18 groupe les résultats globaux obtenus avec l'ensemble des lignées étudiées. On trouvera donc sur cette figure, en dehors de la courbe de longévité normale de la souche, une courbe de longévité pour chacun des

temps de traitement, toutes ces courbes ayant évidemment un point commun correspondant au début du traitement. Si le palier de la courbe témoin correspond sensiblement à la durée de la phase d'incubation, étant donné la pente de cette courbe, il faut admettre qu'au moment du traitement la plupart des lignées possédaient déjà le déterminant de la sénescence.

Les trois courbes établies à la suite du séjour au froid indiquent un rajeunissement ; elles se terminent toutes les trois par une droite dont la

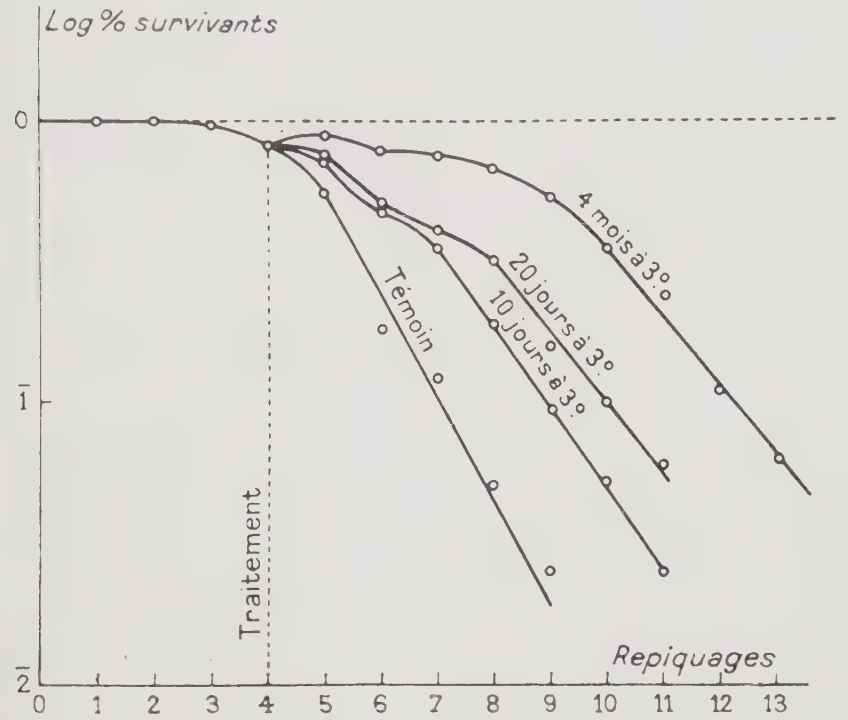


FIG. 18. — Courbe de longévité normale (témoin) de la souche S 73 et courbes de longévité de la même souche après dix jours, vingt jours et quatre mois de séjour au froid. Chaque repiquage correspond à un allongement de 3,5 cm du mycélium. Les 120 lignées étudiées ont été soumises à l'action du froid au moment où l'on effectuait le quatrième repiquage.

pente est sensiblement la même que celle de la courbe témoin. Les courbes correspondant à dix jours et vingt jours de traitement ne sont pas très différentes l'une de l'autre. Elles paraissent constituées de deux parties comprenant chacune un pseudo-palier suivi d'une droite : la première partie est identique pour les deux traitements ; la seconde est nettement distincte en ce qui concerne l'importance du pseudo-palier, mais, même pour le traitement correspondant à vingt jours de séjour au froid, celui-ci ne traduit sûrement pas un rajeunissement total d'une fraction importante des lignées. Il s'agit plus probablement, dans la plupart des cas, d'une

régression de l'évolution du déterminant. On peut penser que, dans les mycéliums les moins touchés, la régression est beaucoup plus régulière et en même temps proportionnelle au temps de traitement, ce qui rendrait compte de la similitude de pente et de l'écartement entre les deux droites.

La courbe correspondant à un traitement de quatre mois est apparemment plus simple à interpréter. On y observe d'abord une légère remontée dont la durée est très brève, puis une chute qui s'amortit en palier dont la longueur est sensiblement égale à celui de la courbe témoin, enfin une droite approximativement parallèle à celle de la courbe témoin. La remontée correspond au rajeunissement des lignées déjà visiblement sénescentes au moment du traitement. Certaines de ces lignées, comme la lignée 63 précédemment envisagée, n'ont sans doute subi qu'un rajeunissement de très faible amplitude, ce qui explique que la courbe redescende rapidement. Les autres lignées, au contraire, qui constituent la majorité, ont subi un rajeunissement total correspondant vraisemblablement à la perte du déterminant, ce qui expliquerait à la fois l'existence du palier, sa longueur et la pente de la droite.

En résumé, on peut schématiser par quelques propositions simples l'action du froid sur les souches du *Podospora anserina*. Les souches n'ayant pas atteint la période d'incubation demeurent jeunes : quel que soit le temps de séjour au froid, elles montrent une longévité normale. Les souches ayant atteint la période d'incubation, qu'elles soient ou non dans la période de sénescence visible, non seulement ne vieillissent pas, mais subissent le plus souvent un rajeunissement. L'importance de ce rajeunissement dépend, d'une part, du temps de traitement et, d'autre part, du stade atteint par les thalles au moment du traitement. Chez les souches très atteintes, un rajeunissement n'est décelable qu'après un temps de traitement assez long ; ce rajeunissement ne se produit pas toujours et il s'agit le plus souvent d'une guérison très provisoire correspondant à une régression très faible de l'évolution du déterminant. Pour les thalles moins atteints, le résultat varie énormément selon le temps de séjour au froid : pour des séjours courts (dix et vingt jours), on ne note généralement qu'une régression dans l'évolution du déterminant, mais elle est régulière et proportionnelle au temps de traitement ; à la suite de séjours prolongés, on observe le plus souvent un rajeunissement total du mycélium, impliquant la perte du déterminant. Il arrive, mais très rarement, qu'un résultat identique soit obtenu avec des thalles très sénescents.

2° ***Le rajeunissement consécutif à l'action d'autres inhibiteurs de croissance.*** — Des essais préliminaires ont montré que les mycéliums desséchés sous vide (lyophilisation) ou maintenus sous atmosphère d'azote étaient tués assez rapidement. Ces traitements ont donc été abandonnés. Au contraire, les thalles supportent très bien, pendant quatre mois et même plus, l'action d'autres milieux conduisant également à une inhibition

presque totale de la croissance : dessèchement du mycélium en atmosphère normale, maintien sous huile, dans de l'eau distillée ou sur le milieu synthétique inhibiteur de Tavlitzki (1954).

L'action de ces inhibiteurs de croissance a été testée pendant des temps variés sur plusieurs souches et en particulier sur les souches S 17 et S 93 représentées, à l'origine, la première par 150 et la seconde par 300 lignées parallèles (1). Nous nous bornerons à donner quelques-unes des courbes obtenues.

Les lignées parallèles de la souche S 93 ont été traitées au moment où 40 d'entre elles étaient déjà devenues sénescentes et où, par conséquent, si

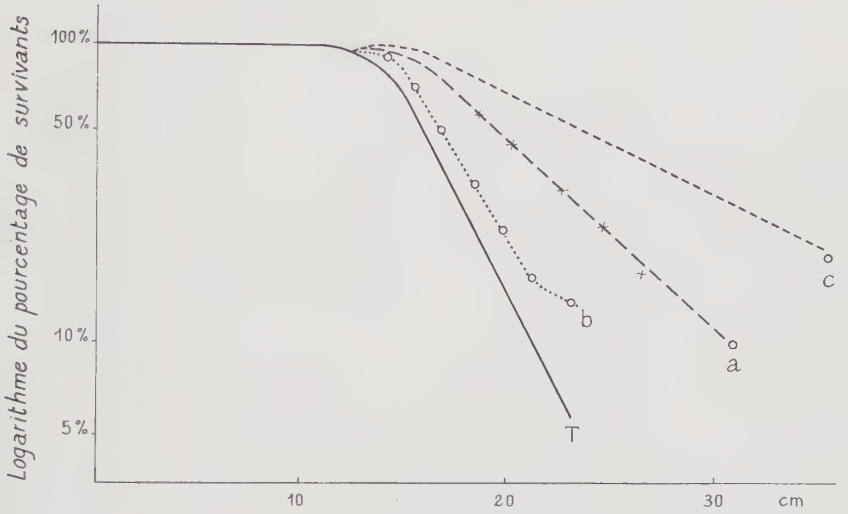


Fig. 19. — Courbe de longévité normale (T) de la souche S 93 et courbes de longévité de la même souche après un mois de traitement par le froid (*a*), par maintien sous huile (*b*), par repiquage sur milieu synthétique inhibiteur (*c*).

l'on tient compte de la courbe de longévité normale de cette souche (fig. 19), la plupart des 260 lignées restantes étaient à un stade relativement précoce de la phase d'incubation. Les thalles ont été conservées au réfrigérateur, sous huile et placés sur milieu synthétique inhibiteur ; ces traitements ont été appliqués pendant un mois, trois mois et six mois. Les lignées parallèles de la souche S 17 ont été traitées au moment où 50 p. 100 d'entre

(1) Il est possible de soumettre en même temps, ou à peu près, un même thalle à divers traitements. Cela revient à réaliser, deux ou trois jours avant le moment choisi, plusieurs cultures à partir d'une même lignée : l'un des semis permettra de continuer l'étude du témoin ; un autre sera placé sur milieu synthétique inhibiteur ; deux autres seront ensemencés en tubes sur gélose et, après quarante-huit heures de croissance, l'une des cultures sera placée au réfrigérateur et l'autre sous huile ; enfin, deux semis seront mis à croître en milieu nutritif liquide et les jeunes mycéliums, après lavage, seront conservés, l'un dans de l'eau distillée et l'autre desséché sur papier-filtre.

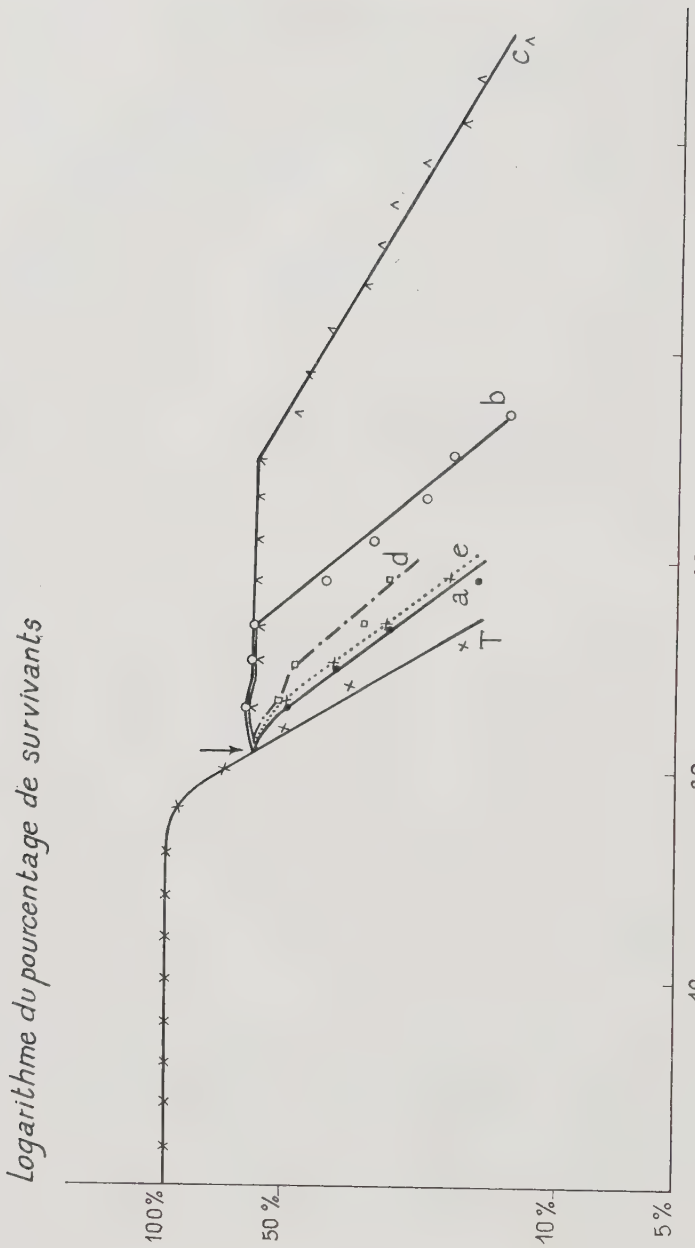


Fig. 20. — Courbe de longévité normale (T) de la souche S 17 et courbes de longévité de la même souche après trois mois de traitement. Traitement par le froid (*a*) ; dessèchement du mycélium (*d*) ; maintien dans l'eau distillée (*e*) ; sous huile (*b*) et sur le milieu inhibiteur sans Mn (*c*). Les lignées ont été traitées au moment où plus de 50 p. 100 étaient déjà devenues sénescentes. Une fraction notable d'entre elles avaient donc déjà été éliminées.

elles (76 sur 150) étaient déjà mortes (fig. 20), c'est-à-dire à un moment où une grande partie des lignées survivantes avaient déjà atteint un stade avancé de la période d'incubation. Ces thalles survivants ont été desséchés en atmosphère normale, soumis à l'action du froid, conservés sous huile, placés sur le milieu synthétique inhibiteur et dans de l'eau distillée.

Chacun de ces traitements a été appliqué pendant un mois, deux mois, trois mois et quatre mois.

Il serait fastidieux et sans beaucoup d'intérêt de rapporter la totalité des courbes correspondant à ces traitements. Nous nous limiterons à indiquer pour la souche S 93 (fig. 19), en dehors de la courbe de longévité témoin, les courbes correspondant à un mois de traitement pour chacune des conditions réalisées (*a*, froid ; *b*, maintien sous huile ; *c*, milieu synthétique inhibiteur). Pour la souche S 17 (fig. 20), en dehors de la courbe témoin, les courbes mentionnées correspondent à trois mois de traitement (*a*, froid ; *b*, maintien sous huile ; *c*, milieu synthétique inhibiteur ; *d*, dessèchement du mycélium ; *e*, maintien dans de l'eau distillée).

Si l'on envisage non seulement les résultats schématisés par les figures 19 et 20, mais l'ensemble des résultats obtenus, on est conduit aux conclusions suivantes : 1° Tous ces traitements qui inhibent presque totalement la croissance du mycélium aboutissent à un rajeunissement du thalle. 2° Comme dans le cas de l'action du froid déjà décrite plus haut pour d'autres souches, le rajeunissement obtenu est d'autant plus important que le traitement est plus prolongé ; ceci est vrai pour chacun des traitements et pour les deux souches testées. 3° Certains traitements, comme le maintien sur le milieu synthétique inhibiteur, paraissent très efficaces dans tous les cas et quel que soit l'état des souches traitées (fig. 19, *c* et fig. 20, *c*) ; le rajeunissement par maintien des souches sous huile ne paraît pas davantage dépendre du stade atteint par le mycélium au moment du traitement, mais il est moins rapide. D'autres traitements ont une action encore beaucoup plus faible, au moins dans les conditions réalisées pour la souche S 17 (fig. 20, *a*, *d* et *e*). Remarquons que deux de ces traitements n'ont été appliqués qu'à des thalles très évolués et, en ce qui concerne l'action du froid, nous avons déjà vu plus haut (fig. 18) et vérifié ici (fig. 20, *a*) que l'efficacité de ce facteur diminue rapidement lorsque les thalles se rapprochent du stade de la sénescence visible.

3° ***Essais de rajeunissement des « ascospores sénescentes » et des thalles « sénescents de naissance ».*** — Dans les expériences précédemment décrites, il n'est pas exclu que le rajeunissement résulte de la croissance de filaments ou d'articles qui n'ont jamais été atteints. Nous aurons l'occasion de revenir sur cette interprétation mais, dès maintenant, nous avons peut-être un moyen d'écarter cette hypothèse, au moins sous sa forme la plus simple. Nous savons qu'il existe dans certains périthèces des « ascospores sénescentes » qui donnent naissance à des thalles de longévités réduites, c'est-à-dire immédiatement en phase d'incubation. Est-il possible de « rajeunir » ces ascospores et les souches qui en sont issues ? La réponse est d'autant plus intéressante en ce qui concerne les ascospores que cela permettrait de savoir, dans une certaine mesure, si un rajeunissement peut être obtenu en absence totale de croissance.

Nous avons vérifié que les ascospores normales maintenues sous huile de vaseline pendant six mois ou un an non seulement conservaient leur pouvoir germinatif, mais conduisaient à des lignées dont la longévité n'était pas modifiée. On sait que, dans certains croisements, à de très rares exceptions près, toutes les ascospores de certains périthèces sont « sénescentes » et que, dans ces cas, les quatre souches issues d'un même asque ont des longévités strictement identiques. Dans de tels croisements, on peut déceler facilement les périthèces sénescents en semant quelques spores de chacun d'eux. Si l'on a pris soin de conserver sous huile les paquets d'asques restants, on peut isoler ensuite les spores d'un certain nombre de tétrades. Pour chaque asque ainsi disséqué, deux des quatre spores peuvent être mises immédiatement à germer, les deux autres étant maintenues sous huile. La longévité des mycéliums fournis par les deux premières indiquera le « degré de sénescence » de l'asque au moment de la maturation des ascospores ; la longévité des mycéliums fournis par les deux autres, après un temps plus ou moins prolongé de séjour dans l'huile, pourra, comparée à la précédente, rendre compte de l'efficacité ou de la non-efficacité du traitement.

Ces expériences, poursuivies aussi bien sur des souches S que sur des souches A, ont donné des résultats extrêmement clairs. Toutes les spores traitées, tout comme les spores témoins, produisent des mycéliums à longévité réduite se trouvant dès leur naissance dans la phase d'incubation. On retrouve, selon les asques, l'hétérogénéité des longévités, mais, pour un asque donné, les deux mycéliums témoins et les deux mycéliums provenant d'ascospores traitées ont des longévités rigoureusement identiques. Ainsi, les ascospores dont la germination est différée pendant six mois et plus non seulement ne perdent pas leur caractère sénescent, mais le conservent avec le degré atteint lors de leur maturation.

Les thalles issus « d'ascospores sénescentes » et qui sont, dès leur naissance, à des stades plus ou moins avancés de la période d'incubation, peuvent être soumis aux divers traitements utilisés précédemment. De telles expériences ont été réalisées en particulier en maintenant ces thalles à basse température et sur milieu synthétique inhibiteur pendant quatre mois et plus. Les résultats observés sont exactement les mêmes que ceux qui concernent les souches devenues normalement sénescentes : les longévités nouvelles obtenues ne s'expliquent que si le déterminant présent au moment de la germination de l'ascospore a été perdu sous l'action du traitement qui se révèle ainsi, au moins dans ce cas, plus efficace que la reproduction sexuelle elle-même. Dans ces dernières expériences, il ne fait aucun doute que les premiers filaments issus de l'ascospore étaient contaminés. Même si la guérison globale du thalle ne traduisait que la croissance d'articles ou de filaments indemnes, il faudrait cependant admettre qu'à l'origine ces articles ou ces filaments avaient subi un véritable rajeunissement.

4° ***Rajeunissement provisoire sous l'action des hautes températures.*** Nous avons vu chapitre II que les mycéliums jeunes mis à croître à 36° C manifestent rapidement et avec une dispersion réduite des symptômes de sénescence. Or, cette même température peut conduire également, en apparence tout au moins, à un résultat différent. Si on maintient à 36° C pendant quelques jours un thalle devenu sénescent à température normale, sa croissance reprend d'une manière très nette en fournissant un mycélium d'apparence saine lorsqu'on le replace à 26° C. Cette nouvelle croissance est de courte durée (trois ou quatre jours) et de nouveau les symptômes de la sénescence se manifestent d'une manière très homogène sur tout le pourtour des cultures. Ce phénomène n'est pas sans rappeler la guérison provisoire observée chez certains virus et, en particulier, le virus σ de la Drosophile.

Nous nous sommes demandé si la température de 36° C était efficace aux diverses phases de la période d'incubation. Dans ce but, nous avons expérimenté sur une série de 300 lignées parallèles de la souche S 93 cultivées à 26° C. Au moment où une cinquantaine de thalles étaient devenus visiblement sénescents, nous avons soumis la totalité des lignées à 36° C pendant sept jours, puis nous les avons replacées à la température initiale. De cette manière, de nombreuses lignées ont subi ce traitement à des phases variées de la période d'incubation.

Les résultats, qu'ils concernent chaque lignée prise individuellement ou l'ensemble des lignées (ils se traduisent alors par une nouvelle courbe), sont difficiles à interpréter. Ils ne sont nets que pour les lignées déjà visiblement sénescentes au début du traitement et qui, toutes, subissent une guérison provisoire, ce qui se traduit sur la courbe par une remontée. Dans les cas où l'on était près de la sénescence visible, aucune variation notable des longévités n'a été observée. Dans tous les autres cas, on note une diminution de longévité qui se traduit par une pente presque verticale de la courbe, mais on observerait le même phénomène si la température de 36° C ne faisait qu'accélérer, comme nous l'avons déjà relevé, la phase d'incubation.

5° ***La possibilité de rajeunissements successifs.*** — Dans beaucoup des expériences précédentes, à partir de thalles sénescents nous avons obtenu de nouvelles lignées qui présentent une longévité comparable à celle des lignées originelles. Nous avons déjà suggéré que ce phénomène correspondait à l'élimination du déterminant de la sénescence. S'il en est ainsi, les lignées rajeunies sont non seulement comparables, mais identiques à des lignées jeunes de même génotype. Dans ces conditions, il devrait être possible de réaliser plusieurs rajeunissements successifs sans modifier la longévité moyenne.

La vérification de cette hypothèse a été faite en utilisant la souche S 93. Trois expériences distinctes et portant sur les mêmes lignées (300 lignées

jumelles) ont été conduites parallèlement. Elles ne diffèrent que par l'agent utilisé pour provoquer le rajeunissement : basses températures pour la première, conservation sous huile pour la seconde, maintien sur milieu synthétique inhibiteur pour la troisième. Dans chaque expérience, trois rajeunissements successifs ont été obtenus : le premier grâce à six mois de traitement, les deuxième et troisième après trois mois du même traitement. Seule, la durée de ces expériences nous a obligés à limiter les rajeunissements successifs à trois. Afin de conserver jusqu'à la fin un nombre élevé de lignées et d'obtenir, le plus rapidement possible, un rajeunissement maximal, le traitement a été appliqué chaque fois dès l'apparition des premiers cas de sénescence.

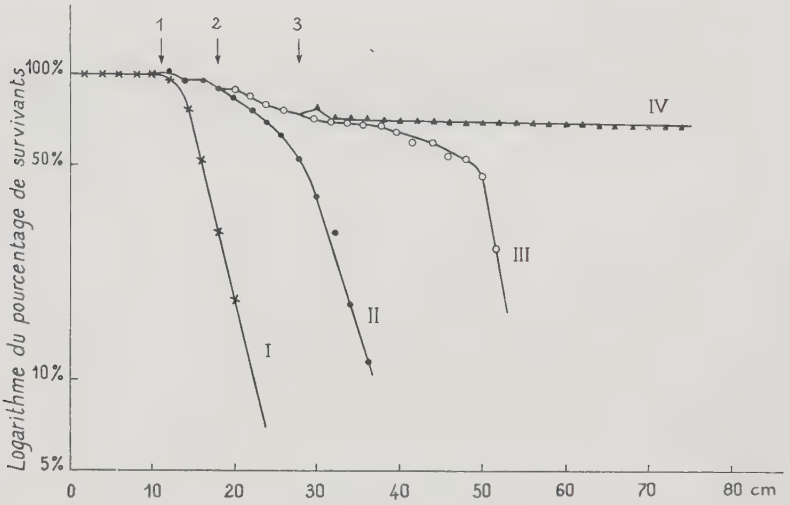


FIG. 21. — Courbes de longévité de la souche S 93. I : témoin ; II, III, IV : premier, deuxième et troisième rajeunissements des mêmes lignées par maintien des cultures au froid pendant six mois (II) et trois mois (III et IV).

Quel que soit le traitement utilisé, on est conduit aux mêmes conclusions. Nous nous bornerons donc à représenter les courbes qui traduisent les rajeunissements successifs après traitement par le froid (fig. 21) et après maintien des thalles sous huile (fig. 22).

La série de courbes représentées par la figure 21 autorise les conclusions suivantes :

1° Chacun des traitements a conduit à un rajeunissement ; on obtient donc effectivement sur une même lignée des rajeunissements successifs.

2° La forme de la courbe témoin indique qu'au moment du premier traitement la quasi-totalité des lignées était touchée. Toutes ne sont pas totalement rajeunies par ce premier traitement, ce qui se traduit par le fait que la courbe correspondante ne présente pas de vrai palier. Le pseudo-palier commence par une légère remontée qui correspond, comme

on peut le vérifier en examinant le devenir des lignées individuelles, aux lignées presque sénescentes au moment du traitement et qui n'ont subi qu'une guérison très provisoire ; la partie qui lui fait suite concerne des lignées déjà plus ou moins touchées et dont la plupart n'ont été l'objet que d'un rajeunissement partiel. La pente qui prolonge ce pseudo-palier est très peu différente de celle de la courbe témoin et la distance de ces deux droites est sensiblement égale à la longueur du palier témoin. L'examen de cette courbe montre qu'au moins 50 p. 100 des lignées manifestent une longévité normale à la suite du traitement, ce qui indique qu'une fraction notable d'entre elles a été rajeunie totalement.

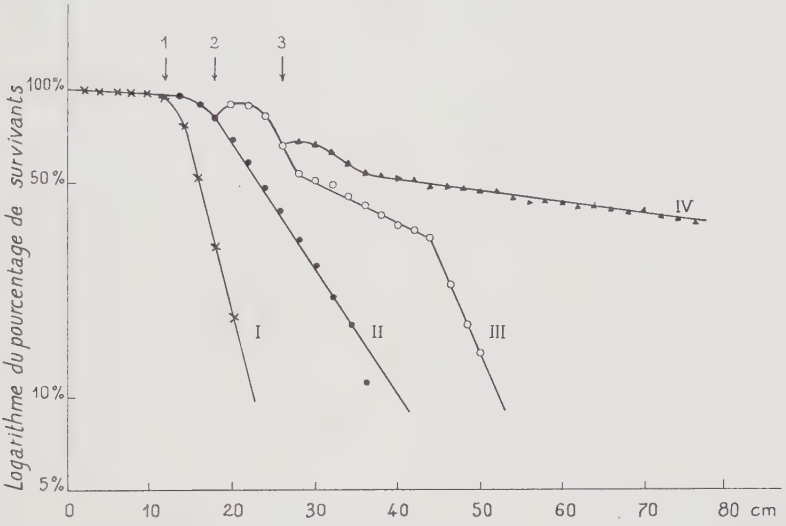


Fig. 22. — Courbes de longévité de la souche S 93. I : témoin ; II, III, IV : premier, deuxième et troisième rajeunissements des mêmes lignées par maintien des mycéliums sous huile pendant six mois (II) et trois mois (III et IV).

3° La courbe obtenue à la suite du deuxième traitement traduit également un rajeunissement très provisoire pour une fraction des lignées (ce qu'on peut vérifier par le devenir des lignées individuelles) et un rajeunissement total pour la majorité des autres. Mais cette courbe présente avec la précédente deux différences très significatives. On obtient encore un pseudo-palier, mais il est beaucoup plus long que le précédent et également bien supérieur au palier de la courbe témoin ; la pente est beaucoup plus forte que la précédente et se traduit par une droite presque verticale. Ainsi, de nombreuses lignées très peu ou pas touchées au moment du traitement ont manifesté, à la suite de celui-ci, une longévité nettement supérieure à la longévité normale de la souche.

4° La courbe correspondant aux lignées ayant subi un troisième traitement n'a pu être construite jusqu'au bout par suite d'infection par un *Mucor*. Elle ne se traduit que par un pseudo-palier qui est presque horizontal en dehors de la légère remontée qui se retrouve chaque fois. Mal-

gré le caractère incomplet de cette courbe, il est hors de doute que ce pseudo-palier est encore beaucoup plus long que le précédent et au moins égal à cinq fois le palier de la courbe témoin. Ceci indique que la grande majorité des lignées ayant subi ce nouveau traitement manifeste des longévités encore plus grandes qu'à la suite du traitement précédent ; comparé aux mêmes lignées témoins, l'accroissement de longévité est encore plus important.

La figure 22 (rajeunissements consécutifs au maintien des thalles sous huile) rappelle beaucoup la précédente. On retrouve sur chacune des courbes, à l'origine des pseudo-paliers, les remontées correspondant au rajeunissement provisoire des lignées les plus atteintes ; apparemment, à la suite de ce traitement, les lignées incomplètement rajeunies sont plus nombreuses, mais on retrouve avec une très grande netteté l'augmentation de la longueur des paliers correspondant au deuxième et surtout au troisième traitement. Là encore, de très nombreuses lignées manifestent une longévité beaucoup plus grande que les lignées témoins correspondantes. Comme dans l'expérience précédente, il nous a été impossible de terminer la courbe correspondant au troisième traitement.

Les anomalies relevées à la suite des deuxième et troisième traitements se retrouvent lorsqu'on utilise le milieu synthétique sans Mn comme inhibiteur de croissance. Là également, les pseudo-paliers correspondant à ces traitements (en particulier le troisième) traduisent une longévité très accrue de nombreuses lignées.

En résumé, conformément à ce que nous avions prévu, en utilisant divers traitements, il est possible de rajeunir une même lignée à plusieurs reprises. Quel que soit l'agent utilisé et le nombre des rajeunissements déjà effectués, une lignée presque sénescente n'est habituellement que très provisoirement rajeunie, mais une lignée moins touchée l'est totalement dans beaucoup de cas. On peut admettre que des lignées nombreuses ont été rajeunies complètement à la suite de chacun des traitements. Si nous ne prenons en considération que ces seules lignées, les résultats obtenus sont cependant beaucoup moins schématiques que prévu ; leurs longévités moyennes successives ne sont pas comparables aux longévités des générations successives d'une même souche ; ces longévités sont de plus en plus grandes et il y a une différence considérable entre la longévité témoin et celle correspondant au troisième rajeunissement.

L'hypothèse de la perte du déterminant de la sénescence à la suite d'un rajeunissement total ne peut pas, à elle seule, rendre compte de ces résultats. L'observation, en cours d'expériences, d'un nombre non négligeable de mutants incolores (dont nous savons qu'ils sont à plus grande longévité que les mycéliums dont ils dérivent : chapitre II, page 693) pourrait suggérer qu'à la disparition du déterminant de la sénescence se surajoute une sélection de noyaux mutés entraînant une sénescence plus

tardive. Toutefois, le fait que cet accroissement se produit à la suite de tous les traitements, qu'il va rapidement en s'accélérant dans tous les cas, qu'il se manifeste dans de très nombreuses lignées traitées indépendamment, nous semble indiquer qu'il s'agit d'un problème plus complexe.

2° Analyse au niveau cellulaire des thalles sénescents et des thalles rajeunis.

Nous avons vu (p. 710) que les inhibiteurs de croissance qui déterminent un rajeunissement global des thalles ne suppriment pas tout allongement des hyphes. Au cours des deux, trois ou six mois pendant lesquels dure le traitement, la croissance continue, mais très lentement. Dans la plupart des cas, les hyphes ne s'allongent que de 2 ou 3 mm en six mois, mais cet allongement s'accompagne d'une ramification intense des filaments de telle sorte que la partie de la culture correspondant à cette période présente un aspect beaucoup plus dense que celui du mycélium normal. Par contre, dans le seul cas où l'on a réussi à arrêter toute croissance (traitement des « ascospores sénescentes »), aucun rajeunissement n'a été obtenu. Ces faits suggèrent qu'il pourrait exister une relation entre le rajeunissement et l'accroissement des thalles qui se produit au cours des divers traitements.

Lorsqu'on traite des thalles déjà visiblement sénescents, cet accroissement, si faible soit-il, présente des modalités instructives. Si l'on dépose des semis découpés dans ces thalles sur le milieu inhibiteur sans Mn, seuls quelques filaments émergent des semis pour se ramifier intensément sur le milieu frais. A basse température ou sous huile, le pourtour de la culture devient très irrégulier : certains secteurs se présentent comme de véritables bourgeons mycéliens plus ou moins nombreux et de tailles variées ; assez fréquemment, ces bourgeons sont séparés par des zones où l'on n'observe aucune croissance notable. Il semble donc que, dans tous ces cas, la croissance se produisant au cours du traitement n'intéresse qu'un petit nombre d'hyphes privilégiées.

Cette hétérogénéité au sein des mycéliums sénescents traités est étayée par des observations plus précises. Lorsqu'on prélève plusieurs semis sur un même thalle traité, on obtient des lignées de longévités différentes. Sur de nombreuses cultures, nous avons recueilli des semis dans des régions où aucune croissance n'était visible à la suite du traitement et d'autres, dans des zones où existaient des bourgeons mycéliens ; c'est toujours dans ce dernier cas que l'on observe le rajeunissement le plus important ; il arrive même, fréquemment, que ce rajeunissement soit total, alors qu'il n'en est pratiquement jamais ainsi pour les autres semis.

Dans le cas des cultures sénescentes de l'*Ascobolus stercorarius*, il est encore beaucoup plus nettement visible que le rajeunissement s'opère à

partir de filaments particuliers ou d'articles individuels. En effet, si l'on abandonne de telles cultures quelques jours à la température ambiante, on observe bientôt une nouvelle croissance qui intéresse des zones bien délimitées et punctiformes à l'origine. L'observation microscopique montre que chacune de ces régions est constituée par de nombreux filaments rayonnants néoformés dont l'origine se limite à quelques hyphes, voire même quelques articles du thalle originel. Lorsqu'on prélève des semis dans les zones de mycéliums anciens et dans les zones de mycélium néoformé, dans le premier cas on observe soit aucune croissance, soit une croissance très réduite ; dans le second cas, des mycéliums régulièrement rajeunis. Ici, aucun traitement particulier n'est à l'origine du rajeunissement ; toutefois, les milieux étant entièrement recouverts de mycélium, la croissance a dû être presque entièrement arrêtée pendant un certain temps. Le mycélium rajeuni finit d'ailleurs par envahir complètement la culture et il est probable que la totalité des filaments préexistants meurent : on sait d'ailleurs déjà que, dans cette espèce, le stade atteint par la sénescence dans les filaments déjà formés évolue rapidement au cours du temps.

Ainsi, d'une manière générale, après des traitements variés qui inhibent presque totalement la croissance, les cultures sénescentes se révèlent hétérogènes. Si cette hétérogénéité préexiste dans les cultures sénescentes non traitées, il doit être relativement facile de la mettre en évidence. Dans ce cas, en effet, on peut penser que des semis très petits (filaments ou articles uniques) peuvent avoir des potentialités différentes.

A partir de mycéliums sénescents S et A dont la croissance était totalement arrêtée, on a obtenu des microsemis de trois manières différentes : *a*) en isolant plus d'une centaine d'hyphes individuelles en chambre à huile à l'aide du micromanipulateur ; *b*) en broyant le mycélium dans un « mixer » (de cette façon on obtient, en milieu nutritif liquide, une suspension de filaments isolés qui peuvent être soit étalés sur gélose, soit mis à croître en milieu liquide agité comme des organismes unicellulaires) ; *c*) en essayant de faire germer des microconidies à partir de thalles cultivés sur milieu au sorbose (Beisson-Schecroun, 1962).

Contrairement à ce qui a été obtenu à partir de thalles normaux (*loc. cit.*), aucune microconidie n'a germé. Certains des fragments d'hyphes isolés au micromanipulateur n'ont montré aucune croissance ; les autres ont conduit à des thalles immédiatement sénescents. Dans le cas des mycéliums dissociés par broyage, seule une bande ayant au maximum 1 cm de largeur et prélevée sur le pourtour des cultures était utilisée. Dans le cas précis d'un des thalles S employés, 1 000 colonies ont été prélevées parmi celles qui étaient visibles en milieu liquide. Sur ces 1 000 thalles repiqués sur milieu gélosé, 217 seulement ont repoussé. Ils se décomposent de la manière suivante : 143 se sont montrés immédiatement sénescents ; 70 le sont

devenus après 2 cm au plus de croissance normale ; 2 ont montré un mycélium d'apparence normale sur 5 à 6 cm ; enfin les deux autres ont conduit à des cultures qui n'ont révélé des symptômes de sénescence que beaucoup plus tard. A partir de ces deux derniers thalles, nous avons pu constituer deux séries de 50 lignées jumelles chacune. La longévité moyenne de ces lignées est celle de la souche originelle : ainsi, dans deux des 1 000 microsemis testés, le déterminant de la sénescence était absent ou avait été éliminé.

Les broyages réalisés avec d'autres souches S ou avec des souches A, ou enfin à partir de thalles « nés sénescents », ont fourni des résultats analogues. En particulier, tous fournissent quelques rares thalles d'apparence et de longévité normales.

A la suite du broyage d'une culture sénescente, beaucoup d'hyphes isolées ne repoussent pas, soit à cause de lésions, soit à cause de leur état sénescent trop accusé. La fréquence de cette dernière catégorie n'est pas mesurable. Il est donc difficile de déterminer même approximativement la probabilité pour une hyphe de donner un thalle normal. Toutefois, compte tenu des chiffres cités plus haut, cette probabilité est certainement inférieure à 1 p. 1 000.

Un filament conduisant à un thalle normal peut être soit un filament indemne du déterminant dès l'origine, soit un filament guéri. Dans le premier cas, une inégale répartition du facteur responsable de la sénescence suffirait à en rendre compte. Dans le second, il s'agirait d'un véritable rajeunissement. Les deux mêmes hypothèses pourraient expliquer la structure hétérogène des thalles sénescents rajeunis. On peut penser qu'au cours des traitements beaucoup de filaments meurent et que seuls repoussent les filaments peu ou pas contaminés ; on peut admettre également que le traitement favorise une « décontamination » de certains filaments ou de certains articles.

Ce sont ces deux mêmes hypothèses que nous retrouvons pour expliquer la structure des thalles sénescents de naissance et que nous avons déjà formulées pour rendre compte de l'existence, à partir d'une mère sénescente, de deux types de fructifications.

Dans l'ignorance où nous sommes de la nature, de l'origine et du mécanisme d'entretien du déterminant, il est difficile de préciser en quoi diffèrent ces deux conceptions. Toutefois, si on les prend à la lettre, certains faits tendent plutôt à montrer que les filaments produisant des cultures normales sont des filaments guéris. Dans le cas du broyage d'une culture sénescente, on peut considérer que chaque hyphe emporte une quantité de déterminant qui oscille autour d'une moyenne. Cela devrait conduire apparemment à une fréquence élevée de thalles très sénescents, à une fréquence extrêmement faible de thalles non atteints et à une fréquence non négligeable de thalles réalisant des états intermédiaires. Or, contrairement à cette attente, la dernière catégorie est très peu représentée. Le même phé-

nomène se retrouve sous une forme encore beaucoup plus accentuée dans la répartition des périthèces nés sur un thalle sénescent.

3° Conclusion.

Au cours des chapitres précédents, nous avons acquis la conviction que la sénescence visible débutait par l'apparition aléatoire d'un déterminant cytoplasmique. Durant la croissance des hyphes, tout se passe comme si la fréquence ou la concentration de ce déterminant augmentait progressivement. Cette évolution, décrite sous le terme de période d'incubation, ne se traduit pas immédiatement. Les anomalies mycéliennes (sénescence visible) n'apparaissent sans doute que lorsqu'un certain seuil est atteint, l'arrêt total de la croissance correspondant alors à un stade encore plus tardif.

Au cours du présent chapitre, nous nous sommes demandé s'il était possible d'obtenir une évolution en sens inverse, soit en faisant régresser la période d'incubation sans néanmoins supprimer le déterminant, soit en conduisant cette évolution régressive jusqu'à la disparition même de celui-ci. A l'extrême, nous avons recherché si, pour une même lignée, on pouvait obtenir plusieurs vieillissements et plusieurs rajeunissements successifs.

Les expériences réalisées concernent deux niveaux. Les unes ont trait à la possibilité d'un rajeunissement global d'un thalle à des stades variés de la période d'incubation ; les autres ont pour objet l'analyse d'un thalle visiblement sénescent au niveau du filament ou de l'article individuel, c'est-à-dire au niveau cellulaire. Des observations concernant l'hétérogénéité des thalles sénescents rajeunis permettent de faire, dans une certaine mesure, la jonction entre les deux groupes de résultats.

Dans le seul cas où toute croissance a été supprimée (conservation des ascospores sous huile), aucun rajeunissement n'a été observé : quel que soit le retard apporté à la germination, le déterminant de la sénescence demeure sans subir aucune évolution.

Le rajeunissement global des thalles peut être obtenu sous l'action d'agents variés (dessèchement, basse température, maintien sous huile, dans de l'eau distillée, sur milieu synthétique sans Mn) jouant le rôle d'inhibiteurs de croissance sans arrêter complètement celle-ci.

Dans la grande majorité des cas, les rajeunissements obtenus sont d'autant plus importants que la période d'incubation était moins avancée. Pour les thalles déjà visiblement sénescents, il ne s'agit le plus souvent que d'un rajeunissement très partiel, c'est-à-dire d'une guérison très provisoire ; pour ces mêmes thalles, un résultat analogue est également obtenu par l'action de températures élevées.

Pour les thalles se trouvant à des stades plus ou moins précoces de la période d'incubation au moment du traitement, le rajeunissement est plus rapide et fréquemment total, le résultat obtenu variant cependant, dans une très large mesure, avec l'agent utilisé. Dans tous les cas, on note une progressivité très nette selon les temps de traitement.

Un rajeunissement partiel se présente comme une régression de la période d'incubation : dès qu'un thalle rajeuni reprend sa croissance, cette période d'incubation évolue de nouveau avec la vitesse et les manifestations habituelles jusqu'à l'arrêt de croissance.

Une lignée complètement rajeunie (au moins à la suite d'un premier traitement) se comporte exactement, quant à sa nouvelle longévité, comme une lignée jeune de même génotype ; elle acquiert de nouveau et d'une manière aléatoire le déterminant de la sénescence et l'évolution de celui-ci s'y poursuit avec les modalités habituelles. Toutefois, lorsqu'on réalise pour une même lignée ou pour un ensemble de lignées jumelles plusieurs rajeunissements totaux successifs, on n'assiste pas à la répétition pure et simple du même phénomène. Pour trois au moins des agents utilisés, on observe, à la suite du deuxième et surtout du troisième traitement, un accroissement considérable de la longévité. Malgré le caractère incomplet des expériences réalisées, la longévité moyenne des lignées traitées à trois reprises est au moins deux ou trois fois supérieure à la longévité originelle de la souche. Pour rendre compte de cet accroissement, qui se manifeste chez la plupart des lignées et pour les trois traitements envisagés avec des modalités semblables, il paraît difficile de faire appel à la seule hypothèse d'une sélection de mutants à plus grande longévité. On pourrait faire également appel à une « mutation » du déterminant lui-même : de nouvelles recherches permettront de tester cette hypothèse.

Les agents susceptibles de provoquer le rajeunissement des mycéliums sénescents provoquent également, avec des modalités analogues, le rajeunissement de thalles « sénescents de naissance ».

Les semis qui donnent des lignées totalement rajeunies peuvent être considérés comme exempts de déterminant. Cela peut signifier que celui-ci a été totalement éliminé sous l'action du traitement ; cela peut signifier également que les thalles traités sont hétérogènes et que seuls certains filaments privilégiés sont à l'origine des nouvelles cultures.

L'analyse des thalles traités au moment où ils étaient visiblement sénescents apporte plusieurs informations en faveur de l'idée d'une sélection, comme l'allure bourgeonnante des cultures ou l'hétérogénéité des thalles issus de semis prélevés dans les divers secteurs d'une même culture. L'hétérogénéité relevée au niveau de ces cultures se retrouve au niveau cellulaire, même dans les thalles sénescents n'ayant subi aucun traitement.

TROISIÈME PARTIE

DISCUSSION DES RÉSULTATS

Au cours de l'exposé des résultats expérimentaux, nous avons essayé de définir, le plus tôt et sous une forme aussi schématique que possible, les diverses phases de la vie d'une souche, laissant pour plus tard la recherche de la signification biologique de chacune des étapes. Nous avons ainsi reconnu, sous les deux phases morphologiques de la croissance d'un thalle (croissance normale et sénescence visible), deux phases physiologiques qui ne leur sont pas superposables et qui diffèrent entre elles par l'absence ou la présence du facteur responsable de la sénescence.

Au cours de la première phase physiologique, dont la fin est marquée par l'intervention d'un événement aléatoire, le clone cellulaire issu d'une ascospore et maintenu en croissance continue dans un milieu homogène présente une parfaite constance de ses caractéristiques. La durée de cette phase est variable car, dès le début de la croissance, le mycélium peut être le siège de l'événement (courbe à un coup) qui conduit à la production de ce que, conventionnellement, nous avons appelé le déterminant de la sénescence.

L'apparition de ce déterminant amorce la seconde phase physiologique. Cette apparition se produit avec une fréquence constante dans des conditions et pour un génotype donnés ; mais cette fréquence varie largement selon le génotype, les méthodes de culture et la nature du milieu. Il est possible que certaines conditions externes permettent d'éviter cet événement, mais, dans la plupart des cas, sa probabilité est suffisamment élevée pour que la totalité des thalles soient atteints en quelques semaines ou quelques mois.

La seconde phase, contrairement à la première, a une durée constante, mais, au cours de son déroulement, les caractéristiques du thalle en croissance ne sont pas stables : elles évoluent. A un mycélium d'allure normale, correspondant à une période d'incubation, succède un mycélium très aberrant dont la croissance s'arrête rapidement. L'apparition d'hyphes anormales et l'arrêt de croissance constituent deux étapes bien définies ; elles correspondent à des seuils dans l'évolution du déterminant. Cette évolution est progressive et paraît être de nature quantitative, la concentration du

déterminant s'accroissant d'une manière continue et inéluctable, et étant toujours la plus élevée dans les éléments du thalle le plus récemment formés.

En l'absence de toute migration nucléaire, le déterminant de la sénescence est capable d'infecter par le canal des anastomoses une hyphe encore indemne de déterminant : on est ainsi conduit à admettre qu'il est de nature extra-chromosomique. La reproduction sexuée étant possible aussi bien au cours de la seconde phase qu'au cours de la première, la réalisation de croisements variés a permis de confirmer la validité de cette hypothèse.

Ces croisements nous ont apporté une autre information. Le déterminant de la sénescence apporté par la mère se transmet par les ascospores avec une fréquence qui peut être élevée : de cette manière, on obtient des souches qui atteignent immédiatement la deuxième phase et dont l'évolution est très raccourcie.

Même si certaines parties de cette interprétation devaient être revisées ou complétées, il apparaît clairement que le problème fondamental concerne ce que nous appelons le déterminant de la sénescence. En effet, si sa nature était connue, le problème de son apparition aléatoire rentrerait très certainement dans un cadre beaucoup plus général ; le problème de son maintien au cours de la croissance du mycélium (hérédité cellulaire) et celui de son évolution, qui lui confère une hérédité cellulaire très particulière, deviendraient sans doute plus accessibles. Son caractère infectieux et sa transmission par voie maternelle au cours de la reproduction sexuelle (hérédité extra-chromosomique) pourraient probablement rendre possible des rapprochements très fructueux. Toutefois, même si actuellement beaucoup de ces questions doivent rester en suspens, certaines caractéristiques de ce déterminant doivent permettre de comparer le phénomène étudié ici avec d'autres dont on peut penser qu'ils procèdent de mécanismes voisins.

Un des aspects intéressants est que la phase sénescente évolue vers une issue : l'arrêt de croissance et la mort. Nous devons rechercher si, au niveau cellulaire, des phénomènes analogues sont connus et ont reçu au moins un début d'interprétation. Cela nous conduira, par exemple, à des comparaisons avec l'évolution des clones de Paramécies et, d'une manière plus générale, avec le phénomène de sénescence chez les autres organismes.

L'existence de deux phases est une situation quasi normale dans la vie d'une souche. Or, des situations du même ordre existent ailleurs. Sont-elles comparables et, dans l'affirmative, quelle est leur signification biologique ?

Les divers aspects que nous venons d'évoquer ne sont pas indépendants et les informations que nous possédons à leur sujet sont de valeurs très inégales. Dans la discussion qui va suivre, nous envisagerons d'abord les

problèmes relatifs au déterminant de la sénescence et à sa nature extra-chromosomique. Nous comparerons ensuite l'évolution qui se produit au niveau cellulaire au cours de la sénescence avec d'autres phénomènes d'arrêt de croissance ou de vieillissement. Enfin, nous essaierons de situer les phases de la croissance des Champignons ou d'autres organismes dans le cadre des phénomènes de différenciation.

1° Le déterminant de la sénescence.

Au cours de l'évolution d'un mycélium en croissance, l'observation directe ne peut révéler que l'apparition de la sénescence visible, qui est aléatoire (chap. I), mais nous avons montré que cette phase est précédée d'une période d'incubation de durée finie, pendant laquelle on peut considérer que le « déterminant » de la sénescence est présent. L'apparition de ce déterminant présente ainsi une dispersion superposable à celle de la sénescence visible. Nous avons vu également (chap. II) que cette apparition correspondait vraisemblablement à un événement unique. Ces caractéristiques (événement unique, brutal et à apparition aléatoire) sont celles des mutations géniques, mais il est apparu très tôt, en particulier au chapitre III, que nous nous trouvions en face d'un phénomène de nature différente, rentrant dans le cadre des phénomènes complexes d'hérédité extra-chromosomique.

1° ***La localisation extra-chromosomique et les modalités de l'évolution du déterminant.*** — Pour obtenir sur un tel sujet des informations plus précises, un organisme du type du *Podospora anserina* présente un certain nombre de particularités intéressantes. Certaines se retrouvent chez beaucoup de Champignons : noyaux haploïdes pendant la majeure partie du cycle, structure filamenteuse, mycélium constitué par des articles communiquant entre eux, existence d'anastomoses naturelles ou possibilité d'en provoquer entre filaments isolés, bouturage facile à partir d'éléments très petits. D'autres sont beaucoup plus spécifiques : au moins dans les souches étudiées, échanges uniquement cytoplasmiques au niveau des anastomoses, réalisation facile de croisements réciproques, existence d'éléments mâles (microconidies) qui apportent peu ou pas de cytoplasme. Chez le *Podospora anserina*, de plus, il n'y a que deux noyaux à l'origine d'un périthèce, de sorte que tous les asques qu'il contient sont aussi identiques que les tétrades provenant d'une même cellule diploïde de Levure qui aurait subi un petit nombre de divisions avant que les cellules filles ne se transforment en asques. Le *Podospora anserina* ne forme pas de spores asexuelles comme, par exemple, les *Aspergillus*, les *Penicillium* ou les *Neurospora* ; toutefois, les éléments sexuels mâles ne sont pas totalement incapables de germer (Beisson-Schecroun, 1962).

L'apparition d'une variation cytoplasmique correspond souvent, comme celle d'une mutation génique, à un changement brutal de phénotype dont les caractéristiques se maintiennent ensuite par hérédité cellulaire. On est conduit, par exemple, à des clones mutés comme dans le cas des Levures « petite colonie » (Ephrussi, Hottinguer et Chimenes, 1949; Ephrussi et Slonimski, 1949) ou à des secteurs modifiés comme chez l'*Aspergillus glaucus* (Sharpe, 1958), le *Pestalozzia annulata* (Chevaugeon et Digbeu, 1960), le *Curvularia pallescens* (Cuzin, 1961).

Dans des cas très privilégiés, on peut mettre en évidence des différences cytologiques décelables entre les formes originelles et mutées : caractère « killer » des Paramécies (Sonneborn, 1959), Levures « petite colonie » (Yotsuyanagi, 1955), modification de la structure ou disparition des plastes (Rhoades, 1949; Michaelis, 1954, 1958; de Deken-Grenson, 1960).

On décrit maintenant de plus en plus fréquemment des cas où le caractère mutant cytoplasmique est infectieux et conduit à la disparition progressive du caractère correspondant de la forme normale : « petites suppressives » chez les Levures (Ephrussi *et al.*, 1955), particules « kappa » chez les Paramécies (Sonneborn, 1959), caractère *mi-4* (Pittenger, 1956) ou *poky* (Mitchell et Mitchell, 1952) chez le *Neurospora crassa*, apparition de secteurs envahissants chez le *Curvularia pallescens*, l'*Aspergillus glaucus* ou le *Pestalozzia annulata.*

Il arrive que l'apparition du mutant paraisse correspondre à la simple perte d'un facteur responsable d'une fonction spécifique : « petites neutres » chez les Levures (Ephrussi, Hottinguer et Tavlitzki, 1949), disparition de certaines potentialités chez l'*Aspergillus glaucus*, l'*Aspergillus nidulans* et le *Penicillium cyclopium* (Jinks, 1961 ; Arlett, 1957, 1960) chez lesquels la nature cytoplasmique de la modification a été mise en évidence par la dédicaryotisation des hétérocaryotes.

Il n'est pas rare que la fréquence de ces variations cytoplasmiques soit beaucoup plus grande que celle relevée habituellement pour les mutations géniques (caractère « petite neutre » chez les Levures, divers types de secteurs modifiés infectants chez les Champignons, etc.) et surtout que cette fréquence varie dans des limites très considérables selon les conditions extérieures (augmentation ou diminution de la fréquence d'apparition des secteurs modifiés chez le *Pestalozzia annulata*, par exemple). Contrairement à ce qui se passe dans le cas des mutations géniques, certains agents ont une action spécifique et hautement efficace : action de l'acriflavine sur la production du mutant « petite colonie » chez les Levures (Ephrussi et Slonimski, 1949), action de la Streptomycine sur les plastes d'Euglènes (de Deken-Grenson, 1960).

Lorsqu'il y a possibilité de réaliser les deux croisements réciproques, ces croisements donnent habituellement des résultats différents et l'hérédité est alors presque toujours maternelle : état stabilisé chez les Drosophiles sensibles au CO_2 (L'Héritier, 1958 ; Brun, 1962), caractères s et s^s chez le *Podospora anserina* (Rizet, 1952), anomalies des tétrades chez le *Coprinus lagopus* (Day, 1959), caractère *poky* et *mi-4* chez le *Neurospora crassa* (Pittenger, 1956 ; Mitchell et Mitchell, 1952), caractère pathogène de certains *Puccinia* (D'Oliviera, 1939 ; Johnson, 1946), stérilité mâle cytoplasmique chez un certain nombre de Végétaux supérieurs, cas de certaines panachures (*status albomaculatus*), hybrides entre races géographiques différentes chez l'*Epilobium* (Michaelis, 1954).

Dans les cas où il est possible de faire l'analyse des tétrades, on note évidemment une absence de ségrégation mendélienne, comme dans le cas des Levures « petites neutres » ou « petites suppressives » (Ephrussi, Hottinguer et Tavlitzki, 1949 ; Ephrussi *et al.*, 1954), dans le cas d'une anomalie de croissance (Rizet, 1942 *b*), dans celui des souches s et s^s chez le *Podospora anserina* (Rizet, 1952 ; Beisson-Schecroun, 1962) ou encore dans celui du caractère *poky* chez le *Neurospora* (Mitchell et Mitchell, 1952). L'absence de ségrégation mendélienne ne signifie pas que les quatre produits d'une même méiose soient toujours identiques : ainsi, chez l'*Aspergillus glaucus* (Sharpe, 1958), on trouve dans les tétrades produites par la forme A des ascospores B et des ascospores A en proportions variables. Elle ne signifie pas davantage que des ségrégations végétatives soient impossibles lors de la transmission de certains caractères par hérédité cellulaire : de telles anomalies peuvent apparaître dans les cultures issues d'extrémités d'hyphes (Jinks, 1961) ou de spores asexuelles (Sharpe, 1958 ; Jinks, 1961). La fréquence des anomalies de transmission est évidemment en relation avec la nature et la concentration du facteur responsable. Leur existence ne s'expliquerait aisément que dans les cas où l'un des états correspondrait à l'absence du déterminant.

Dans les observations sur les phénomènes de sénescence rapportées au cours de ce mémoire, comme dans celles faites par Sharpe (1958) et Jinks (1959) sur l'*Aspergillus glaucus* et par Chevaugeon et Digbeu (1960) sur le *Pestalozzia annulata*, on retrouve un certain nombre des situations qui viennent d'être résumées. Dans tous ces cas, on est en présence de deux états successifs. On passe du premier au second à la suite d'un événement brutal et aléatoire. La fréquence de cet événement n'est pas négligeable et, dans la plupart des cas, bien supérieure à celle d'une mutation génique ou à celles d'autres mutations cytoplasmiques comme le passage de l'état s^s à l'état s (Rizet, 1952). Chez le *Podospora anserina*, elle varie largement avec le génotype ; elle varie également beaucoup avec les conditions de culture et il en est de même chez le *Pestalozzia annulata* (Chevaugeon, résultats non publiés).

L'observation au microscope électronique de filaments atteints et non atteints du *Podospora anserina* révèle des différences considérables ; toutefois, comme, au cours de la seconde phase, seul le mycélium aberrant a été étudié, ces différences pourraient ne représenter que des altérations secondaires (Delay, résultats non publiés).

Dans tous ces cas, l'état sénescent est infectieux pour l'état normal. Chez le *Podospora anserina*, cette infection s'opère en absence de migration nucléaire ; dans les autres cas, même s'il n'en est pas ainsi, elle est plus rapide que les éventuelles migrations de noyaux. Chez l'*Aspergillus glaucus*, si l'on réalise des hétérocaryotes et qu'on opère une dédicaryotisation, il est possible d'obtenir des thalles sénescents de l'un ou l'autre des génotypes. Chez le *Podospora anserina*, l'infection n'est possible que dans les hyphes très jeunes et sa vitesse est faible. Chez l'*Aspergillus glaucus* ou le *Pestalozzia annulata*, comme chez l'*Ascobolus stercorarius*, elle progresse beaucoup plus rapidement, même dans les filaments déjà différenciés.

Le *Podospora anserina* constitue jusqu'à présent la seule espèce chez laquelle il a été possible d'étudier la transmission de la sénescence par voie sexuelle. Nous avons vu que cette transmission s'opère uniquement par voie maternelle et que, contrairement à d'autres caractères cytoplasmiques du même organisme (Rizet, 1952), elle ne s'opère pas dans tous les cas. Elle rappelle étrangement, par contre, celle du caractère « petite suppressive » chez la Levure. Aux deux types de zygotes (« grande » ou « petite ») trouvés chez la Levure (Ephrussi *et al.*, 1954), correspondent ici deux types de périthèces, les uns entièrement atteints avec absence de ségrégation dans les asques, les autres complètement indemnes. De plus, aux divers degrés de « suppressivité » décrits, correspondent les fréquences extrêmement différentes de périthèces sénescents selon les souches de *Podospora* étudiées. Toutefois, à la dérive du degré de suppressivité décrite chez les Levures, on n'a trouvé, dans la transmission de la sénescence du *Podospora*, aucun équivalent.

Les autres observations qui, dans le cadre des phénomènes d'hérédité cytoplasmique, confèrent à la sénescence son originalité paraissent en relation avec les caractéristiques de chacun des deux états du mycélium. L'état initial, non sénescent et de durée aléatoire, est homogène dans l'espace et dans le temps. Au contraire, si on en excepte le cas du *Pestalozzia annulata* maintenu sur milieu très pauvre (Chevaugeon et Digbeu, 1960), l'état sénescent (c'est-à-dire celui correspondant à la présence du déterminant) montre une évolution continue, progressive, dont le terme est constitué par la mort ou au moins par l'arrêt de croissance des articles terminaux. Ainsi, si chacun de ces deux états se maintient au cours de la croissance, la transmission du second est d'un type très particulier, chaque élément du thalle étant plus atteint que l'élément dont il dérive.

Ce deuxième état correspond, dans les conditions habituelles, à une quinzaine de jours de culture (c'est-à-dire qu'il comporte plus de dix jours de croissance normale) et à une augmentation de masse considérable du mycélium. Si, au cours de cette croissance, on fait des prélèvements successifs nombreux, tous emportent le déterminant et conduisent à des thalles de longévité réduite. A des semis contigus correspondent des longévités strictement identiques, alors que les semis successifs conduisent à des longévités de plus en plus faibles sans qu'aucun hiatus ne vienne troubler cette continuité. Il existe ainsi un grand nombre d'états différents constituant un véritable gradient. On retrouve cette multiplicité d'états dans les divers périthèces nés sur une même souche sénescente et, à un degré moindre, dans les divers asques d'un même périthèce sénescent. Un certain nombre de ces faits pourrait indiquer que la progressivité ainsi mise en évidence correspond à des variations d'ordre quantitatif dans la répartition spatiale du déterminant. Le fait que, dans les infections expérimentales, chez le *Podospora anserina*, chez l'*Aspergillus glaucus* (Sharpe, 1958) ou chez le *Pestalozzia annulata* (Chevaugeon et Digbeu, 1960), les thalles infectés montrent des périodes d'incubation très nettement raccourcies est en accord avec cette idée. Dans les articles proches des points d'anastomose, l'invasion est sans doute massive et va en s'amenuisant au fur et à mesure qu'on s'éloigne de ces points. Rappelons, en effet, que chez le *Podospora*, lorsqu'on découpe un filament envahi en tronçons, les thalles obtenus sont à longévité d'autant plus réduite que les fragments étaient situés plus près du point d'anastomose. Dans le cadre de l'hypothèse formulée, il est nécessaire d'admettre que, même à un stade peu évolué de la période d'incubation (c'est-à-dire correspondant aux concentrations les plus basses), chaque filament ou groupe de filaments contient un nombre élevé de déterminants. Avec cette conception, c'est la seule manière d'expliquer, lorsqu'on fait des prélèvements sur un thalle sénescent, la multiplicité des degrés de sénescence obtenus et l'identité entre les longévités de mycéliums issus de semis contigus. C'est également la manière la plus simple de comprendre que, sur une mère sénescente, les périthèces soient très diversement atteints, que, dans un même périthèce sénescent, les asques semés isolément fournissent des thalles de longévités variées et enfin que, dans un même asque, les longévités des quatre thalles issus des quatre ascospores soient strictement identiques, quel que soit le stade de la période d'incubation auquel ils correspondent.

Même à partir d'une culture très atteinte et issue parfois d'une seule ascospore uninucléée « sénescente », il est possible de mettre en évidence un retour à l'état originel. Chez l'*Ascobolus stercorarius*, certains articles ou filaments individuels de cultures sénescentes paraissent capables de redonner des mycéliums normaux; il en est de même chez le *Coprinus radiatus* (Prévost, communication orale). Chez le *Podospora*, le broyage de cultures visiblement sénescentes, arrivées presqu'au terme de leur évolution, fournit cependant quelques filaments qui conduisent à des mycé-

liums non atteints. Ce sont sans doute de tels filaments qui sont sélectionnés ou induits lors du traitement par les divers agents qui conduisent au rajeunissement. Dans un périthèce atteint, il arrive, quoique rarement, que l'une des quatre spores d'un asque sénescent conduise à un mycélium jeune. Chez l'*Aspergillus glaucus*, les conidies nées sur des thalles atteints ne germent généralement pas : quelques-unes d'entre elles donnent cependant naissance à des thalles normaux (Jinks, 1959). Chez le *Pestalozzia annulata* on retrouve cette alternative, mais dans ce cas la deuxième catégorie est de beaucoup la plus fréquente. Chez le *Podospora*, alors que même les semis de toute petite taille (filaments ou articles isolés), prélevés sur des cultures visiblement sénescentes, conduisent presque dans tous les cas à des thalles de longévité très réduite, il arrive que la grande majorité des périthèces qui se développent sur ces mêmes thalles soient indemnes du déterminant.

Si l'on envisage en même temps les faits qui suggèrent l'idée d'une concentration élevée du déterminant et ceux qui révèlent, en particulier à certains stades, un retour fréquent de l'état sénescent vers l'état originel, il apparaît peu plausible que la « guérison » résulte d'une simple répartition au hasard du déterminant. Le passage de l'état sénescent à l'état originel résulte probablement d'un phénomène plus complexe.

L'ensemble des faits que nous venons d'analyser ne laisse aucun doute quant à la localisation cytoplasmique du déterminant. Peut-être permettent-ils également des hypothèses plus précises sur la nature de celui-ci.

2° ***L'origine et la nature possible du déterminant.*** — On sait toute l'ambiguïté qui s'attache à la notion de particule héréditaire, puisqu'on peut grouper sous ce vocable aussi bien des organites cellulaires parfaitement définis et même visibles microscopiquement que des structures de niveau moléculaire. Toutefois, lorsqu'on se trouve en présence de phénomènes d'hérédité extra-chromosomique, il est pour le moins commode de se demander si l'on est ou non en face d'éléments autoreproductibles comme des virus, des épisomes ou ce qu'on groupe parfois sous le terme général mais vague de plasmagènes.

Quelle que soit la nature du déterminant cytoplasmique, toute hypothèse explicative doit satisfaire à un certain nombre d'impératifs. 1° Des deux états successifs, c'est l'état sénescent qui se révèle infectieux, de sorte que c'est à ce stade qu'il faut situer le déterminant efficace. 2° Les deux états cytoplasmiques s'auto-entretiennent (avec cette particularité que le second évolue continuellement au cours de la croissance dans le sens d'une aggravation). 3° On peut cependant, avec une probabilité faible mais constante dans des conditions données, passer de l'état normal à l'état sénescent : la potentialité d'obtenir le déterminant efficace est donc toujours présente au cours de la première phase. 4° Il est possible de revenir

de l'état sénescent à l'état normal : dans ce cas, il n'est pas absolument certain que l'état normal ainsi retrouvé soit toujours réellement l'état originel (expériences relatives aux rajeunissements successifs), mais la potentialité de reformer le déterminant efficace est toujours restaurée.

L'hypothèse d'un déterminant capable d'auto-multiplication n'est pas incompatible avec ces desiderata, même si l'observation directe au microscope électronique n'a pas permis jusqu'à maintenant de le mettre en évidence. S'il en est ainsi, on peut penser que ce déterminant est absent des souches non atteintes, non seulement sous sa forme infectieuse, mais même sous une forme voisine non infectieuse qu'on puisse considérer comme un « allèle ». L'infection provoquée se présenterait alors dans le cas le plus simple comme l'auto-multiplication de ce facteur lorsqu'il est introduit dans une place vide et il suffirait d'admettre, pour expliquer ensuite la progressivité du phénomène au cours de la croissance du thalle, que sa vitesse de multiplication est légèrement supérieure à celle des autres éléments cellulaires. En principe, une telle hypothèse pourrait être testée si l'on disposait de mutants de cet agent infectieux. Nous avions pensé les trouver dans nos souches d'origines géographiques variées. On sait en effet que certaines de ces souches ont des longévités très différentes, correspondant à des périodes d'incubation très variables. De plus, elles produisent, lorsqu'elles sont visiblement sénescentes, des fréquences caractéristiques de périthèces atteints. Malheureusement, contrairement à ce qui se passe pour le facteur s (Beisson-Schecroun, 1962), le déterminant de la sénescence n'est jamais transmis par le canal d'une anastomose entre souches de races différentes ; le barrage qui se forme conduit à la mort de l'article mixte, sans doute avant le passage du déterminant dont on sait que la diffusion est lente. On pourrait espérer surmonter cette difficulté en utilisant non plus des mycéliums d'origines différentes, mais certains descendants de leur croisement, capables de produire l'un ou l'autre des déterminants des souches parentales et ne formant plus barrage entre eux. Toutefois, il s'agit d'un travail extrêmement long et il est peu probable que l'on aboutisse à une situation facile à interpréter. On peut peut-être envisager une autre source de déterminants mutés. Nous avons vu (chap. IV) que les lignées rajeunies plusieurs fois manifestaient une longévité très accrue et suggéré que cette propriété pourrait ne pas dépendre du génotype, mais du déterminant lui-même. S'il en était ainsi, il serait très facile d'obtenir des thalles ne différant que par la nature de leur déterminant, mais cela reste à prouver.

Le caractère auto-reproductible du déterminant pourrait être également étayé par l'observation de discontinuités dans la transmission de l'état sénescent. De telles discontinuités existent, mais elles se présentent de telle manière qu'il est difficile de les considérer comme une preuve de l'existence de particules auto-reproductibles. Nous avons vu, en effet, que

leur distribution est difficilement conciliable avec l'idée qu'elles résultent d'une répartition spatiale inégale du déterminant.

Même si le déterminant de la sénescence n'est pas identifié à une particule auto-reproductible sous sa forme la plus schématique ou la plus générale, il n'est pas inutile d'envisager dans quelle mesure les modèles de particules habituellement reconnus rendraient compte des résultats. Qu'il s'agisse des hypothétiques plasmagènes, ou des épisomes, ou des virus, nous sommes amenés à admettre que ces éléments existent sous deux états. Dans le cas d'un plasmagène, l'apparition du déterminant efficace correspondrait à une mutation et il serait nécessaire que l'élément muté se multiplie plus vite que les autres éléments cellulaires. On pourrait envisager que cet élément muté se substitue graduellement à l'élément normal et on rendrait ainsi compte du caractère infectant ; mais il deviendrait très difficile d'expliquer le retour à l'état initial. Il faudrait supposer, soit l'existence de mutations réverses, soit la coexistence des deux types d'éléments pendant toute la phase d'incubation ; il faudrait admettre de plus que la reproduction sexuelle chez le *Podospora* et la reproduction asexuelle dans d'autres espèces fassent disparaître d'une manière sélective les éléments infectants. Nous devrions ainsi compléter l'hypothèse de base par des hypothèses complémentaires, impliquant un ou plusieurs mécanismes de régulation ou de sélection dont la vérification directe et globale n'est guère concevable.

Si nous faisons appel à l'hypothèse d'un épisome (Jacob et Wollman, 1958), nous pouvons l'imaginer « intégré » dans la phase initiale et « libre » dans la phase correspondant à l'état infectieux. Pendant cette seconde phase, sa multiplication serait, comme celle du facteur F^+ chez *Escherichia coli*, plus rapide que celle des éléments cellulaires normaux. Toutefois, la possibilité d'infection de l'état initial laisserait supposer l'absence d'immunité et sans doute la coexistence possible dans une même unité cellulaire de l'élément intégré et de l'élément infectieux. Cette coexistence est requise également pour expliquer les caractéristiques du retour à l'état initial au cours duquel l'élément infectieux serait perdu, alors que l'état intégré subsisterait régulièrement. Remarquons d'ailleurs que cette situation est quasi générale dans les mutations cytoplasmiques infectieuses rencontrées chez les Champignons. Resterait à expliquer la disparition parfois très fréquente des éléments infectieux, en particulier au cours de la reproduction sexuelle. Nous sommes donc ainsi conduits non seulement à modifier le schéma classique des épisomes, mais, comme dans le cas des plasmagènes, à compléter cette conception par des hypothèses supplémentaires.

Même si, sous sa forme actuelle, et peut-être trop limitative, l'hypothèse d'un épisome peut être difficilement prise en considération, cela n'élimine pas nécessairement l'idée que le déterminant puisse correspondre à un

virus. Que le provirus soit présent dans toutes les souches et dans tous les éléments du thalle n'a rien d'absolument invraisemblable si l'on se réfère à l'existence des virus latents chez beaucoup d'Insectes (Vago, 1953). Dans quelques cas déjà connus, le virus génétique et le virus mûr infectieux semblent pouvoir cohabiter dans une même cellule (L'Héritier, 1962 *a*). Chez le *Podospora*, aucune infection n'a été décelée en l'absence de contact cytoplasmique, mais, chez l'*Helminthosporium victoriæ* (Lindberg, 1959), une telle possibilité a été décrite sans que la démonstration soit vraiment convaincante. Au cours des expériences d'infection expérimentale au niveau d'une anastomose entre deux filaments individuels, rien n'a été observé qui rappelle clairement une phase d'éclipse, mais il faut réaliser qu'ici l'existence de virus mûrs n'est pas indispensable pour rendre compte du type de contamination observé ; cette objection ne conduit donc pas forcément à rejeter l'hypothèse. Toutefois, s'il s'agit réellement d'un virus, celui-ci n'échappe pas aux impératifs déjà mentionnés : vitesse de multiplication plus grande que celle des éléments cellulaires normaux, existence très tôt après l'apparition du déterminant d'un très grand nombre d'unités virales, nécessité d'un mécanisme qui rende possible le retour vers l'état originel.

Si l'on doit, quel que soit le type de particules auto-reproductibles envisagé, faire nécessairement appel à des hypothèses supplémentaires, on peut se demander si, provisoirement tout au moins, il n'est pas plus simple d'écarter l'hypothèse des particules elle-même. Imaginer un système sans particules auto-reproductibles revient à interpréter tout différemment le déclenchement de l'infection et à rechercher quelle pourrait être la nature de l'« amorce » qui est à la base de la contamination.

Dans le cas le plus simple, au moins théoriquement, on peut penser que l'état sénescent correspondrait à l'état activé d'un gène, alors que, dans la forme originelle, ce gène ne serait pas fonctionnel. Ce serait alors, comme dans l'hypothèse formulée à propos des états s et s^s du même organisme, le produit de l'activité du gène qui servirait d'inducteur à son fonctionnement (Beisson-Schecroun, 1962). Dans le cas de la sénescence, on voit mal comment tester une telle hypothèse sous sa forme la plus simple. Or, il faudrait supposer un fonctionnement de plus en plus actif du gène au cours de la croissance et, au niveau de chaque cellule, une induction quantitative dépendant de la concentration de l'inducteur présent.

L'élément transitoire servant d'amorce et capable de s'auto-entretenir pourrait ne correspondre à l'apparition d'aucune synthèse nouvelle. Il pourrait s'agir d'une structure ordonnée comme une structure supramoléculaire ou plus simplement d'une structure protéique secondaire ou tertiaire dont les éléments de base seraient toujours présents, mais qui, en l'absence de modèle préexistant, n'aurait au maximum qu'une probabilité très faible de se produire. De tels « assemblages » ne sont pas sans analogie

avec le phénomène de maturation dans le développement des virus (Schramm, 1958), mais ils peuvent être imaginés en dehors de toute structure auto-reproductible. Rappelons à ce sujet les discussions de Danielli (1959), Weiss (1958), Hotchkiss (1958) et les observations très curieuses de Sonneborn et Dippell (1961 *a* et 1961 *b*) relatives au maintien, au cours des générations cellulaires, d'anomalies dans la structure du cortex (deux bouches, par exemple) chez la Paramécie.

Il n'est pas impossible que, chez le *Podospora*, une hypothèse de ce type puisse, sans qu'on la modifie beaucoup, rendre compte d'un fait bien établi et dont le sens, jusqu'ici, nous échappe complètement : la corrélation quasi générale (chap. II) entre la probabilité d'apparition du déterminant et la rapidité de son évolution.

Imaginons qu'une structure A existe dans la forme originelle avec une concentration variable selon les souches et que cette structure A présente une certaine probabilité de se modifier pour donner l'état B. La fréquence d'apparition spontanée de la structure B dépend évidemment de la concentration primitive de A. Si l'on fait l'hypothèse que l'existence de l'état B favorise le passage de A vers B, la transformation provoquée de A en B se produira d'autant plus souvent que la concentration de A sera plus élevée ; elle sera également d'autant plus fréquente que la concentration de B sera devenue plus forte. Dans ce système, le rôle joué par la concentration de la structure A expliquerait clairement la corrélation rappelée plus haut entre la fréquence d'apparition spontanée du déterminant et sa rapidité d'évolution. Le rôle joué par la structure modifiée B serait de nature à rendre compte de l'apparente auto-multiplication du déterminant de la sénescence qui se traduit par sa propriété infectieuse et son évolution progressive. On peut réaliser aisément que de telles transformations ne se produisent que dans les éléments en croissance, donc aux extrémités des filaments, ce qui expliquerait que le stade atteint dès l'origine par les articles devenus âgés ou les « ascospores sénescentes » demeure stationnaire.

On peut enfin faire l'hypothèse que l'amorce n'est pas constituée par l'apparition d'une structure ou d'une organisation nouvelle, mais que les deux états du mycélium (initial et sénescent) correspondent pour le même système à deux équilibres de flux. Une telle hypothèse a été schématisée à l'origine pour les systèmes biologiques par Delbrück (1949). On connaît maintenant des situations en accord avec ce schéma (Novick et Wiener, 1957 ; Cohn, 1958 ; Cohn et Horibata, 1959). Si l'on tient compte de la structure cénocytique des mycéliums, l'analyse théorique faite récemment par Szilard (1960) n'est pas incompatible avec l'idée que, dans de tels systèmes, l'un des états puisse être infectieux (L'Héritier, 1962 *b*).

De telles conceptions présentent sur celles mettant en jeu des particules auto-reproductibles un certain nombre d'avantages. Elles rendent compte plus facilement du passage d'un état à l'autre ; elles permettent de mieux comprendre que le rajeunissement conduise à l'état originel ; elles rendent

très plausible que les changements d'état soient fréquemment liés à certains stades du développement (vie ralentie, formation de spores asexuelles différenciées comme chez le *Pestalozzia annulata*, reproduction sexuelle) ; elles permettent également de comprendre plus aisément, et sans faire appel à une concentration énorme de particules, l'homogénéité des articles ou des filaments voisins dans un thalle en période d'incubation. Enfin, nous avons relevé plus haut des analogies, peut-être formelles mais nombreuses, qui existent entre le comportement de l'état sénescent et celui du caractère « petite suppressive » chez les Levures. Dans ce dernier cas, certains zygotes résultant de la copulation d'une « grande » et d'une « petite suppressive » montrent un équilibre instable pouvant évoluer vers le caractère « grande » ou vers le caractère « petite » et dont on peut, dans une certaine mesure, orienter l'évolution (Ephrussi *et al.*, 1955). On voit mal comment une hypothèse simple faisant intervenir des particules autoreproductibles rendrait compte en même temps des deux situations. Il n'est sûrement pas impossible de les expliquer l'une et l'autre par des systèmes d'équilibre de flux ou d'interaction de structures.

2° La sénescence des Champignons, modèle possible de mécanisme cellulaire dans le déterminisme du vieillissement.

Nous avons signalé dans l'introduction de ce travail qu'à l'exception des Paramécies aucun phénomène de sénescence n'avait été mis en évidence dans les cultures d'organismes unicellulaires, pas plus que dans les cultures de tissus qui, au moins dans le cas des animaux, sont très semblables aux précédentes. Si des phénomènes de cette sorte s'y produisent, ils conduisent à deux situations différentes selon l'absence ou la présence de phase d'incubation. Dans le premier cas, à moins que la fréquence du phénomène ne soit extrêmement grande, les cellules atteintes sont rapidement éliminées et il n'y a aucune chance de les déceler. Dans le second, les résultats dépendent de la fréquence d'apparition des cellules atteintes et de l'importance de la phase d'incubation ; si celle-ci est longue et que le phénotype ne se modifie que tardivement, chaque « semis » peut contenir de nombreuses cellules touchées et le résultat dépend essentiellement dans ce cas du nombre d'individus utilisés pour effectuer un repiquage. Le phénomène n'est facilement décelable que si ce nombre est petit, ce qui est précisément le cas dans les élevages de Paramécies. Chez les Champignons, la situation n'est pas fondamentalement différente, mais le fait que les hyphes demeurent en place à la surface des milieux gélosés favorise la lecture du phénomène. S'il existe une longue phase d'incubation, le changement de phénotype, au moment où il se produit, intéresse tout un secteur de la culture et est donc facilement décelable. La structure cénocytique permettant ou favorisant la contamination ne fait que rendre le phénomène plus évident.

La mise en évidence de phénomènes comparables à ceux que nous avons décrits n'est donc sans doute facile que chez les organismes multicellulaires ; même dans ce cas, il s'agit nécessairement d'événements suivis de phases d'incubation ; la structure qui convient le mieux est, sans conteste, la structure filamenteuse et cénocytique.

On connaît effectivement, chez les Champignons filamenteux, d'autres phénomènes qui conduisent à l'arrêt de croissance ou à la mort. Chez l'*Ascobolus stercorarius* et le *Podospora anserina*, plusieurs cas de croissance rythmique (Chevaugeon, 1959 *a* et 1959 *b*) procèdent vraisemblablement d'un mécanisme de ce type. Ce mode de croissance peut être schématisé de la manière suivante : sur milieu gélosé, un semis issu d'une spore ou d'un filament isolé conduit à un disque mycélien dont le rayon, au départ, s'accroît proportionnellement au temps ; puis l'allongement des hyphes devient de plus en plus lent en même temps que celles-ci se ramifient de plus en plus intensément ; au bout d'une période de durée définie, l'accroissement du disque s'arrête complètement. Peu après, quelques filaments se remettent à croître ; leur allongement et leur ramification font que, bientôt, une couronne mycélienne dense se forme autour du disque primitif; au cours de cet accroissement, l'augmentation de diamètre et la ramification suivent les mêmes règles que précédemment. La durée de croissance de chacune des couronnes successives est très constante, mais cette durée varie selon l'espèce et surtout selon la souche envisagée. Les variations de la vitesse de croissance lors de la constitution d'une « vague » traduisent plusieurs états du mycélium ; tous les éléments situés sur un même cercle sont au même état, l'homogénéisation se faisant par le canal des anastomoses. Si l'on prélève un semis de taille habituelle sur le pourtour d'une des couronnes mycéliennes, ce semis fournit une culture dont le disque central est plus petit que celui de la culture originelle. Ainsi, la croissance de chacune des vagues résulte d'un phénomène progressif dont le degré s'égalise à chaque niveau par le canal des anastomoses et dont le terme est l'arrêt total de la croissance. Ceci rappelle tout à fait, à la mort près, l'évolution du phénomène de sénescence. Les filaments privilégiés qui sont à la base de chacune des vagues posent sensiblement les mêmes problèmes, quant à leur nature et à leur origine, que les filaments issus de cultures sénescentes et conduisant à des thalles normaux. Ici, toutefois, chaque filament semé individuellement, quel que soit le lieu de son prélèvement, conduit toujours à des disques mycéliens de taille maximale : la bascule vers l'état originel se produit donc régulièrement. Il est difficile de connaître l'importance qu'il faut attacher à cette particularité, car nous avons vu que, dans certains cas de sénescence, les spores asexuelles ou sexuelles formées sur des thalles contaminés sont généralement non atteintes. On connaît des souches à croissance rythmique correspondant à plusieurs génotypes, mais chacune ne diffère que par un seul gène d'une souche à croissance normale (Nguyen Van, 1962).

Chez le *Neurospora crassa*, Sheng (1951) a décrit un mutant, *nd*, chez lequel l'allongement des hyphes s'arrête régulièrement après une croissance définie. Aucun rajeunissement n'a été observé au cours de la multiplication végétative. Par contre, le retour à l'état originel se produit régulièrement lorsqu'on réalise un hétérocaryote ou un croisement avec une souche non *nd*. Il n'est pas impossible que ce phénomène soit comparable à une « croissance rythmique réduite au disque central ».

Chez le *Podospora anserina*, Bernet (1962, *a* et *b*) a étudié une incompatibilité cytoplasmique résultant de l'action de deux gènes non allèles *C* et *D*. Il peut donc, à la suite du croisement $Cd \times cD$, réunir les deux gènes actifs *C* et *D* dans un même noyau et réaliser ainsi un mécanisme d'auto-incompatibilité. L'ascospore uninucléée *CD* n'est pas immédiatement létale et sa germination est banale. A l'origine, la croissance du mycélium est normale, puis s'atténue graduellement et finit par s'arrêter. L'arrêt se produit au bout d'un temps défini dans des conditions données, mais cette durée varie avec le milieu. Si l'on découpe le mycélium en fragments limités à un article et qu'on sème chacun de ces éléments sur du milieu frais, les résultats varient selon le stade auquel a été effectué la fragmentation. Si l'opération est faite pendant la période d'allongement régulier du mycélium, l'histoire est la même que précédemment; si, au contraire, elle est réalisée au moment où la vitesse de croissance est déjà réduite, on assiste à un développement nettement raccourci. Un certain temps après l'arrêt de croissance, les manifestations cytoplasmiques de barrage, analogues à celles déjà décrites chez le même organisme (Schecroun, 1959) ou chez le *Neurospora* (Garnjobst et Wilson, 1956), deviennent visibles dans tout le mycélium et on assiste bientôt à la mort de la plupart des articles. Toutefois, quelques rares articles survivent et peuvent être le point de départ de nouveaux thalles. Certains de ceux-ci manifestent la longévité très faible des mycéliums dont ils sont issus ; d'autres, une longévité encore plus réduite ; d'autres enfin, une longévité très fortement accrue. Dans ce dernier cas, Bernet a montré que les gènes *C* et *D* se présentaient comme « désamorcés », leur fonctionnement pouvant se « déclencher » à nouveau par la suite.

Dans cet exemple on retrouve, lors de l'évolution d'un thalle, une progressivité qui aboutit à l'arrêt de croissance et presque toujours à la mort. Si l'on part d'articles isolés, l'évolution est totalement réversible pendant la première période ; au-delà d'un certain seuil, cette réversibilité ne se produit pratiquement plus. Toutefois, quel que soit le stade d'évolution atteint, la probabilité d'une réversion totale vers l'état originel ne devient jamais nulle. On sait que l'incompatibilité entre les souches *cD* et *Cd* résulte de l'interaction de facteurs cytoplasmiques liés à la présence des gènes *C* et *D* ; rien n'indique que le mécanisme change lorsque ces gènes sont réunis dans le même noyau. La situation n'est sans doute pas fondamentalement différente de celle décrite dans le cas des barrages entre souches *S* et *s* (Beisson-Schecroun, 1962); dans ces deux cas, nous sommes en présence

de facteurs cytoplasmiques directement liés aux gènes et plusieurs faits invitent à penser que la progressivité observée correspond à l'accroissement de leur concentration. Chez le *Neurospora crassa*, dans une situation analogue, Wilson, Garnjobst et Tatum (1961) ont montré que ces facteurs sont constitués par des protéines. L'hypothèse qu'il s'agit d'enzymes contrôlés par les gènes d'incompatibilité est donc très plausible. Il resterait à envisager si, à partir de cette interprétation, on peut aboutir à un modèle transposable au cas de la sénescence ou si des modèles déjà connus pourraient s'appliquer ici. Nous ne ferons que rappeler certains aspects de l'induction de la β-galactosidase chez *Escherichia coli*. Aux faibles concentrations d'inducteur (T. M. G., par exemple) dans le milieu, l'entrée de la première molécule dans la cellule est aléatoire ; celle-ci déclenche alors la formation de galactoside-perméase qui, à son tour, permet l'entrée de nouvelles molécules d'inducteur dans la cellule. Par le jeu de ces mécanismes, on aboutit ainsi à une concentration croissante d'inducteur dans la cellule et la même progressivité se retrouve pour la galactoside-perméase et pour la β-galactosidase. On est conduit finalement à un maximum qui se maintient au cours des divisions cellulaires, même si la concentration de l'inducteur dans le milieu diminue fortement. Précisons que les étapes du phénomène ne sont décelables que lorsque la concentration de l'inducteur dans le milieu est très faible. Un modèle de ce type pourrait rendre compte de l'apparente autocatalyse du déterminant de la sénescence dans la mesure où l'on admet que sa concentration augmente jusqu'au seuil correspondant à la mort des filaments. Ajoutons, toutefois, que l'activation aléatoire d'un gène, préalablement inactif et dont le fonctionnement ne serait soumis ensuite à aucun mécanisme de régulation, pourrait conduire au même résultat.

Dans les exemples cités précédemment, les phénomènes se présentent sous une forme suffisamment schématique pour qu'on puisse espérer en obtenir une interprétation satisfaisante. Cela ne diminue en rien l'intérêt qu'il y a à rapprocher la sénescence des Champignons de phénomènes concernant des organismes très différents, même s'il n'est pas présentement évident qu'ils résultent de mécanismes analogues.

Dans la dégénérescence des Paramécies, on assiste également à un phénomène progressif dont le terme est la disparition de certains clones. Toutefois, dans ce cas, si les anomalies sont réellement les conséquences plus ou moins lointaines des modifications de structure du macronucleus (Sonneborn et Schneller, 1955 *c*), il s'agit de phénomènes qui ne sont certainement pas comparables à ceux que nous avons décrits.

Chez les Végétaux supérieurs, on sait que la dégénérescence des clones correspond probablement à des phénomènes très variés et résulte, dans les exemples les mieux connus, de la présence de virus. Toutefois, cette interprétation ne convient certainement pas à tous les cas.

Chez beaucoup d'Animaux, le nombre des mitoses est limité. Au cours des premiers stades de l'embryogénèse, il se produit une différenciation très rapide qui conduit à divers types cellulaires. Chaque cellule ou chaque groupe de cellules d'un type déterminé est alors le point de départ d'un clone qui donnera un tissu. Dans certains de ces tissus, très rapidement, la multiplication cellulaire s'arrête ; dans d'autres, des mécanismes particuliers conduisent au remplacement continuel des cellules (cellules épithéliales, hématies, leucocytes, etc.). Chez ces organismes, on peut envisager une sénescence globale, mais le caractère progressif de son évolution repose uniquement sur des observations descriptives. On peut cependant définir une longévité. Celle-ci est très différente selon les espèces et, pour une espèce donnée, elle dépend du génotype et des conditions de milieu (Comfort, 1956). Malgré ces analogies, il demeure difficile de comparer cette sénescence globale avec la sénescence des Champignons. Le seul aspect comparable pourrait être le ralentissement graduel du renouvellement de certains types cellulaires. Ce rapprochement présente cependant un intérêt. Le déterminisme cytoplasmique de la sénescence des Champignons met l'accent sur un type de mécanisme, rarement évoqué, mais sans doute susceptible de poser, sous un jour entièrement nouveau, divers problèmes touchant à l'évolution des tissus chez les Métazoaires. La possibilité pour certains éléments, donc pour certaines cellules modifiées, de revenir à l'état originel, sans changement de génotype, en constitue un aspect particulièrement intéressant.

3° La sénescence des Champignons dans le cadre des problèmes de différenciation.

Au cours de la discussion qui précède, nous avons été amenés à citer chez les Champignons un certain nombre de variations qui présentent les mêmes caractéristiques générales et dont on sait, dès maintenant, qu'elles sont très fréquentes. Leur apparition est brutale ; elles sont transmissibles par hérédité cellulaire ; ces « mutants » correspondent à une modification de nature cytoplasmique et sont capables de transformer, par contamination progressive et par le canal des anastomoses, la forme originelle. La fréquence d'apparition de certains d'entre eux est telle que toute culture non mutée fournit régulièrement des « secteurs mutés ». Comme la structure cénocytique du thalle permet la contamination des secteurs normaux, la croissance se présente régulièrement comme la succession de deux phases distinctes. Dans la plupart de ces cas, en modifiant les conditions de culture, on a réussi à augmenter considérablement la fréquence d'apparition de la forme mutante. Chez le *Pestalozzia annulata*, où plusieurs de ces mutants sont connus, on a montré que l'apparition de l'une de ces formes résulte d'un double événement (courbes à deux coups), ce qui implique l'existence de plus de deux phases (Chevaugeon, résultats non publiés).

Les caractéristiques de ces « mutants » pourraient laisser supposer que, même dans la nature, ils se substituent très rapidement à la forme « sauvage ». Or, apparemment, quel que soit le mode d'isolement des souches, on ne les obtient jamais directement. En culture, ils constituent toujours la deuxième phase de la croissance. On peut raisonnablement supposer que des mécanismes autres que la sélection au niveau des hyphes assurent régulièrement le retour à l'état originel.

Dans le cas d'un des « mutants » décrits chez le *Pestalozzia annulata* (Chevaugeon et Lefort, 1960), les filaments isolés et les conidies ne transmettent jamais la modification. Chez le *Curvularia pallescens* (Cuzin, 1961), l'état « t », mutant et infectieux, n'est pas davantage transmis par les thallospores ou les conidies, mais il est transmis par une fraction des filaments semés isolément. Chez l'*Aspergillus glaucus* (Sharpe, 1958), les conidies et les ascospores nées sur la forme mutante A et semées individuellement donnent des thalles dont beaucoup représentent la forme originelle B. Chez le même organisme, les caractères de résistance à certains poisons (Briault, 1956 ; Mather et Jinks, 1958) transmis régulièrement au cours de la multiplication des thalles ne le sont que rarement par les conidies et jamais par les ascospores. Chez le *Pestalozzia annulata* (Chevaugeon et Digbeu, 1960), une fraction notable des conidies nées sur les thalles sénescents conduisent à des mycéliums ne présentant plus ce caractère. Dans le cas de la sénescence de l'*Aspergillus glaucus*, on retrouve le même phénomène, mais la fréquence de réversion est beaucoup plus faible (Jinks, 1959). Chez le *Podospora anserina*, la multiplication d'un thalle sénescent à partir d'articles isolés ne conduit que rarement à la forme jeune. Ce sont pourtant de telles réversions qui doivent être à la base des rajeunissements provoqués. Chez ce Champignon, lorsqu'on part d'un thalle sénescent, la reproduction sexuelle elle-même ne réussit pas toujours à faire disparaître le caractère « mutant » ; toutefois, sur certaines souches tout au moins, elle est presque toujours efficace.

Ainsi, ces états mutants, qui se transmettent régulièrement au cours de la multiplication cellulaire, se présentent néanmoins comme des états transitoires qui basculent avec une relative facilité vers l'état originel. Cette bascule ne se produit avec une fréquence notable que lorsque la continuité cellulaire est assurée par un élément de très petite taille : fragments d'hyphes, spores asexuelles, zygotes ; il n'est pas contraire aux faits de penser que, pour chaque exemple, cet ordre dans l'énumération correspond à une gradation dans l'efficacité. Ce retour au type originel peut être considéré comme une « dédifférenciation », ce qui revient à considérer l'apparition des mutants comme un phénomène épigénétique correspondant à un exemple de différenciation cellulaire.

Vu sous cet angle, l'existence chez certains Champignons de deux phases successives, dont l'état normal opposé à l'état sénescent ne constitue

qu'un exemple, peut être comparée à des situations nombreuses connues depuis longtemps ou ayant fait l'objet d'observations récentes chez les Végétaux supérieurs.

Chez certaines Gymnospermes, l'existence d'une phase de jeunesse très différente de la phase adulte est classique et on sait que les graines nées sur la phase adulte reproduisent la forme de jeunesse. Chez certains Végétaux comme les Caféiers, où des rameaux plagiotropes naissent sur des tiges orthotropes, ces rameaux se maintiennent identiques à eux-mêmes par multiplication végétative, mais, lorsqu'ils portent des graines, ces graines conduisent à des tiges orthotropes.

Chez les *Citrus* (Frost, 1938 ; Cameron et Soost, 1952 ; Frost, Cameron et Soost, 1957), les graines apogamiques conduisent à des individus différents de ceux dont elles proviennent ; ce n'est qu'après plusieurs bouturages successifs que l'on revient au type habituel qui, ici, correspond au type différencié.

Dans le cas des hybrides interspécifiques d'*Epilobium* étudiés par Michaelis (1958), les deux croisements réciproques donnent des individus très différents malgré l'identité de leur génotype : les uns ont une taille normale, alors que les autres ne mesurent que quelques centimètres. Or, sur ces individus nains, Michaelis observe des mutations de bourgeons nombreuses qui appartiennent à un nombre de types limité et qui, dans l'ensemble, se produisent dans un certain ordre, le terme ultime étant constitué par un phénotype se rapprochant de celui de l'hybride réciproque.

Le fait que, dans chacun de ces cas, les diverses formes, correspondant très vraisemblablement au même génotype, ne manifestent aucun caractère infectant lorsqu'elles sont en continuité naturelle ou provoquée (greffes), n'indique pas qu'il s'agit de phénomènes de nature différente de ceux décrits chez les Champignons. Ces deux types d'organismes présentent, en effet, des organisations et des structures très différentes (en particulier continuum cytoplasmique dans un cas, structure cellulaire vraie dans l'autre).

Dans chacun des exemples que nous venons de rappeler, qu'il s'agisse de Champignons ou de Végétaux supérieurs, nous retrouvons deux phénomènes importants : *a*) l'existence de deux ou plusieurs phénotypes ne correspondant à aucune modification du génotype et transmissible par hérédité cellulaire (cette situation a déjà été discutée très longuement) ; *b*) la succession de ces phénotypes dans un certain ordre au cours de la croissance.

Chez les Végétaux supérieurs, si on fait abstraction du cas complexe des hybrides de Michaelis, la reproduction sexuelle conduit toujours au type originel : elle apparaît ainsi comme un mécanisme toujours efficace de rajeunissement. Elle n'est pas toujours seule à jouer ce rôle. Dans le cas des *Citrus*, l'intervention d'embryons nucellaires suffit. Chez certains

Phanérogames, on observe parfois, au cours de la croissance ou de la multiplication végétative, le passage de la plagiotropie à l'orthotropie ; dans certains cas, le phénomène paraît sporadique ; divers traumatismes peuvent le provoquer avec une certaine régularité.

Chez les Champignons, les mécanismes de « réversion » sont variés. La forme originelle tirée de la nature est toujours la forme non infectieuse. Sur cette forme primitive se produisent des « mutants » de type infectieux très divers. Le retour au type primitif peut être assuré aussi bien par reproduction sexuelle que par reproduction asexuelle : ce phénomène se produit avec des probabilités variables mais fréquemment élevées (jusqu'à 100 p. 100) lorsque la continuité est assurée par un élément uninucléé ou au moins de petite taille. Contrairement à ce qui se passe chez les Végétaux supérieurs, la reproduction sexuelle n'est pas efficace dans tous les cas et nous avons vu qu'une souche de *Podospora* issue d'une ascospore peut naître sénescente, la probabilité de cette situation étant parfois très élevée.

Au cours de cette dernière partie de la discussion où les problèmes sont envisagés sous l'angle de la différenciation, nous avons omis volontairement de comparer les phénomènes décrits chez les Champignons à la différenciation des tissus d'Animaux supérieurs. En effet, même dans le cas des Végétaux où les situations paraissent plus simples et la comparaison plus plausible, nous ignorons s'il s'agit d'autre chose que d'analogies. Pour l'instant, nous retiendrons seulement que les Champignons, en nous fournissant des situations faciles à analyser, nous ont apporté un modèle de différenciation. Il faut maintenant essayer de parfaire ce modèle pour en dégager la signification profonde ; ce n'est qu'ensuite que l'on pourra valablement s'interroger sur son degré de généralité.

RÉSUMÉ

Ce travail concerne les phénomènes de « sénescence » chez quelques Champignons et, en particulier, chez l'Ascomycète *Podospora anserina*. Il a pour point de départ plusieurs observations faites par Rizet et qui peuvent être résumées ainsi : 1° il est impossible d'obtenir la multiplication végétative indéfinie de la souche du *Podospora anserina* couramment utilisée au laboratoire (1953) ; 2° l'arrêt de croissance est précédé d'une période très courte pendant laquelle la morphologie du mycélium est aberrante et cette aberration est transmissible par voie maternelle au cours de la reproduction sexuelle (1957) ; 3° l'apparition de ces anomalies se présente comme un phénomène aléatoire (1953).

Ces phénomènes présentaient *a priori* un double intérêt. On retrouvait chez un nouveau micro-organisme des phénomènes comparables à la dégénérescence des clones connue chez les Infusoires ciliés depuis longtemps (Maupas) et réétudiée récemment (Sonneborn), ce qui pouvait permettre d'obtenir au niveau cellulaire des informations sur le mécanisme intime de la sénescence. On se trouvait, sans doute, en présence d'un nouveau cas d'hérédité cytoplasmique chez un organisme se prêtant particulièrement bien à l'expérimentation. Chacun de ces aspects méritait d'être approfondi. Leur conjonction ne faisait qu'en rehausser l'intérêt en nous faisant entrevoir, sous un jour nouveau, les problèmes de la nature et du déterminisme du vieillissement.

Nous avons d'abord étudié la généralité du phénomène chez les Champignons. Nous avons ensuite analysé avec soin l'évolution d'une souche au cours de sa multiplication végétative, en étudiant la cinétique du déclenchement aléatoire du processus de sénescence et en observant les modalités de son évolution ultérieure. Cette évolution, intercalée entre le déclenchement initial et le moment où la sénescence s'exprime dans les caractères de croissance du mycélium, correspond à ce qui a été appelé « période d'incubation ». La loi de mortalité de chaque souche pouvant être étudiée avec précision et ayant été trouvée variable selon les souches, nous avons recherché si ces différences étaient héréditaires et tenté d'analyser les facteurs internes (génotype) ou externes qui jouent un rôle dans leur déterminisme. Des expériences portant sur du matériel d'origine variée, et surtout conduites avec de nouvelles méthodes (greffes de filaments et mélange du cytoplasme par des techniques microchirurgicales), ont, d'autre part, été entreprises en vue de confirmer la localisation cytoplasmique du déter-

minant de la sénescence et de préciser sa nature. Enfin, nous avons essayé, en modifiant les conditions de culture, soit d'empêcher ou d'arrêter le vieillissement des souches, soit de provoquer leur rajeunissement partiel ou total.

La signification des faits rapportés a été surtout discutée dans le cadre des problèmes d'hérédité extra-chromosomique. Ce que leur analyse peut apporter à la solution des problèmes de la physiologie et de la différenciation cellulaire a également été envisagé.

Schématiquement, on peut résumer les résultats obtenus de la manière suivante :

1. L'impossibilité de la multiplication végétative indéfinie se retrouve chez toutes les souches du *Podospora anserina* étudiées, quels que soient leur génotype, leur origine et les conditions de culture réalisées. Ce même phénomène se retrouve également chez des espèces appartenant à divers groupes de Champignons. Si l'on tient compte des grandes différences de longévité observées et de la présence probable, chez beaucoup d'espèces, de mécanismes de rajeunissement, rien n'indique qu'il ne s'agisse pas d'un phénomène absolument général.

2. La croissance de chacune des souches du *Podospora anserina* étudiées se décompose en deux phases qui ne se superposent pas aux deux états mycéliens successifs (normal et aberrant). La première se caractérise par l'absence du déterminant de la sénescence ; pour chaque souche, l'apparition de celui-ci correspond à un événement unique qui, dans des conditions données, se produit aléatoirement avec une probabilité définie. Une fois cet événement produit, on entre dans la seconde phase (phase d'incubation) qui, au début, n'est décelable par aucun caractère mycélien visible ; ce n'est qu'à un stade avancé de l'évolution du déterminant que sa présence s'exprime par des anomalies mycéliennes, le stade ultime correspondant à l'arrêt total de la croissance. Pour chaque souche et dans des conditions données, cette phase d'incubation a une durée constante.

Ainsi, lorsqu'on envisage, pour une souche homocaryotique donnée, un grand nombre de lignées parallèles et que l'on représente leur loi de mortalité dans un système de coordonnées semi-logarithmiques, on obtient un graphique comprenant deux phases successives : un palier sensiblement égal à la durée de la phase d'incubation et une droite dont la pente est fonction de la probabilité d'apparition du déterminant. L'établissement de cette loi de mortalité permet également de définir et de déterminer la longévité moyenne de chaque souche.

3. La longévité moyenne d'une souche de génotype défini est un caractère héréditaire. Les différences complexes de génotype telles que celles de souches d'origines géographiques variées peuvent se traduire par des écarts très considérables dans les longévités moyennes ; des écarts du

même ordre de grandeur résultent parfois de variations portant sur un seul gène. Ainsi, dans les mycéliums ne différant que par leur signe, les souches + présentent habituellement une longévité plus prolongée que les souches —.

Pour une souche donnée, la longévité moyenne est, d'autre part, fonction des conditions de culture. Elle est d'autant plus grande que la température est plus basse ; elle est plus élevée à l'obscurité qu'à la lumière ; elle est plus importante sur des milieux pauvres que sur des milieux riches. La technique de multiplication végétative joue également un rôle important : l'utilisation de très petits semis ou des repiquages fréquents diminuent la longévité, qui est maximale lorsqu'on arrive à éviter tout repiquage.

Selon les facteurs qui sont à la base des variations de longévité, celles-ci peuvent porter, soit uniquement sur le palier de la courbe de longévité (c'est-à-dire sur la durée de la période d'incubation), soit uniquement sur la pente de la droite (c'est-à-dire sur la probabilité d'apparition du déterminant), soit en même temps sur ces deux paramètres.

4. Même au stade de la sénescence visible, les mycéliums du *Podospora anserina* sont encore capables de fructifier. Le déterminant de la sénescence peut être transmis au cours de la reproduction sexuelle. Cette transmission ne s'opère que par voie maternelle. Dans un croisement donné, elle n'intéresse qu'une fraction des périthèces, fraction très largement variable selon les souches. Les périthèces sont très généralement homogènes : ou bien le déterminant est présent dans la quasi-totalité des ascospores et il n'y a pas de ségrégation dans les asques, ou bien, au contraire, aucune des ascospores du périthèce ne le contient. Cependant, dans certains cas, il existe des périthèces mixtes.

Grâce à des techniques de microchirurgie, on peut réaliser une anastomose entre une hyphe atteinte et une hyphe non atteinte par le déterminant de la sénescence. Celui-ci est alors transmis, en l'absence de toute migration nucléaire, de l'hyphe sénescente vers l'hyphe saine. Il se généralise, ensuite, dans l'ensemble du thalle issu de l'hyphe ainsi « contaminée », même si le contact a été supprimé.

L'ensemble de ces faits impose l'idée que le déterminant de la sénescence est localisé dans le cytoplasme et qu'il s'y comporte comme un élément infectant.

5. Lorsque les cultures sont faites à une température assez basse pour la croissance de cet organisme (16° C), la probabilité d'apparition du déterminant de la sénescence est très faible ; elle est apparemment nulle lorsque les thalles sont maintenus à une température encore beaucoup plus basse (3° C).

D'autre part, le maintien au réfrigérateur ainsi que divers autres facteurs qui ont pour effet commun d'inhiber presque complètement la croissance sans l'arrêter complètement (maintien sous huile, dans de l'eau

distillée, sur milieu synthétique sans Mn, dessèchement) conduisent à un rajeunissement des thalles déjà atteints par le déterminant au moment du traitement, qu'il s'agisse de thalles « sénescents de naissance » ou de thalles devenus sénescents au cours de leur croissance. Ce « rajeunissement » global peut consister en une régression plus ou moins importante du processus de sénescence. Ceci se traduit par un allongement de la période d'incubation et conduit même très fréquemment, lorsqu'il y a disparition totale du déterminant, à un retour complet à la phase juvénile. L'importance du rajeunissement obtenu dépend de la nature du traitement, de son temps d'action et de l'état du mycélium traité.

Le rajeunissement obtenu sous l'action de ces traitements ne concerne probablement pas, au moins dans les mycéliums les plus atteints, tous les éléments du thalle. Il est probable que la croissance ultérieure ne se produit dans beaucoup de cas qu'à partir de filaments privilégiés dont le traitement favorise peut-être la sélection. Il en est sûrement ainsi dans le cas de l'*Ascobolus stercorarius*.

Un mycélium normal issu du rajeunissement d'un thalle sénescent redevient sénescent dans les mêmes conditions que la première fois. Il peut être rajeuni de nouveau et ce cycle peut être répété à plusieurs reprises. Toutefois, les longévités moyennes obtenues après plusieurs rajeunissements successifs complets d'une lignée deviennent, quel que soit le traitement utilisé, de plus en plus grandes et bientôt très supérieures à la longévité témoin caractéristique de la souche.

6. Plusieurs hypothèses peuvent, à première vue, rendre compte de l'évolution du déterminant de la sénescence au cours de la période d'incubation. La seule qui paraisse cependant compatible avec l'ensemble des observations faites est d'admettre que cette évolution est de nature quantitative. Une fois le processus enclenché, la concentration du déterminant s'accroît d'une manière continue et inéluctable. L'accroissement est localisé aux extrémités des filaments en croissance, ce qui fait que la concentration est toujours la plus élevée dans les éléments du thalle les plus récemment formés.

La répartition du déterminant paraît généralement très homogène dans les éléments de même âge. Le rajeunissement spontané de certains éléments du mycélium se produit cependant de temps à autre. Ce phénomène survient, soit dans de rares filaments d'un thalle sénescent, soit au moment de la formation de certains périthèces sur des cultures sénescentes, soit lors de la délimitation de certaines rares ascospores des « périthèces sénescents » ; enfin il est peut-être à la base des filaments privilégiés sélectionnés par les « traitements rajeunissants ». Ce phénomène peut correspondre à des irrégularités dans la distribution spatiale du déterminant. Une autre hypothèse est que ce déterminant peut être spontanément détruit dans certains éléments mycéliens. Le fait qu'on obtienne généralement à partir de ces éléments des mycéliums normaux ou presque indemnes, d'une part, et des mycéliums très sénescents, d'autre part, sans

retrouver toute la gamme des longévités réduites précédemment décrites, est plutôt en faveur de la seconde interprétation.

7. Les possibilités que le déterminant de la sénescence puisse être un virus, un épisome ou qu'il résulte d'un mécanisme épigénétique sont envisagées dans la discussion générale de ce travail.

[Laboratoire de Génétique Physiologique du C. N. R. S. et Laboratoire de Génétique de la Faculté des Sciences de Paris (Centre d'Orsay).]

SUMMARY

This study concerns the phenomena of "senescence" in the Ascomycete *Podospora anserina*. It is based upon several observations made by Rizet: 1° that it is not possible to obtain an indefinite vegetative multiplication of the *P. anserina* strain currently used in this laboratory (1953); 2° that the cessation of growth is preceded by a very short period during which the morphology of the mycelium is abnormal and that this abnormality shows maternal inheritance (1957); and 3° that the occurence of these anomalies is randomly distributed.

The phenomena are interesting from two points of view: —first, as a new instance of a microorganism showing phenomena similar to the degeneration of clones described in the ciliate Infusiora; —and second, as a probable case of cytoplasmic heredity. Each of these aspects separately seemed worthy of further examination. The fact of their interrelation increased their interest.

We began by determining whether the phenomenon is a general one in molds. We then analyzed the evolution of a strain during its vegetative multiplication, with a study of the kinetics of the randomly occuring onset of the senescence process, and the ways of its subsequent evolution. This evolution corresponds to what has been termed the "incubation period". The rate of loss of viability could be accurately determined, and was found to vary with the strain studied. We therefore attempted to demonstrate whether these differences are hereditary in nature and to analyse the various factors, internal (genotype) and external, which might determine such differences. Experiments using strains of various origins and several newly developped methods, such as hyphæ grafts and cytoplasm mixing by microsurgical techniques, were carried out in order to confirm the cytoplasmic localization of the factor determining senescence and to define its nature. Lastly we attempted, by modifying growth conditions, to slow down or prevent completely the ageing of the strains and to cause their partial or complete rejuvenation.

The significance of the facts observed is discussed chiefly within the framework of the problems of extra-chromosomal heredity. The contribution such an analysis may provide towards a solution of the problems of cell physiology and differenciation is also considered.

The results obtained may be briefly summarized as follows:

1° Indefinite vegetative multiplication has proved impossible in *P. anserina* for all genotypes and growth conditions used. This is equally true for other molds.

2° The growth of each strain of *P. anserina* is divisible into two phases which do not coincide with normal and abnormal states of the mycelium. The first is marked by absence of the factor determining senescence; the appearance of the factor is due to a single chance event. The beginning of the second phase (the incubation period) is not reflected in any visible feature of the mycelium. Later, the evolution of the determining factor is shown by anomalies in the mycelium and finally by cessation of growth. In a system of semi-logarithmic co-ordinates, the rate of loss of viability of a strain, established by the study of a large number of cell lineages, takes the form of a biphasic curve with a plateau more or less equal to the duration of the incubation phase followed by a straight line, the slope of which is a function of the probability of the appearance of the determining factor.

3° The average longevity of a strain is a hereditary character. It depends on the genotype and on growth conditions (temperature, lighting, inoculum size, frequency of transfer). Some factors influence particularly the probability of the appearance of the determinant; others, the duration of its development.

4° Senescent mycelia of *P. anserina* retain capacity to fructify. During sexual reproduction the determinant of senescence is transmitted by the mother to a fraction of the fruiting bodies. There is never any segregation in the asci. A healthy hypha may be infected by a senescent hypha through cytoplasmic contact and in absence of nuclear migration. The senescence determinant behaves like an infectious cytoplasmic element.

5° Various treatments, which inhibit growth almost completely, cause rejuvenation of the thalli when applied to mycelia containing the determinant. Such rejuvenation may be complete and a new cycle may begin. The significance of these phenomena is discussed.

6° Some discontinuities and in particular the absence of the determinant in some parts of the senescent thalli are the result either of an irregular distribution of this determinant or of spontaneous rejuvenation. However most data fit in with idea that the concentration of the determinant increases during the incubation period, its concentration being highest in the most recently formed hyphæ. The various possibilities as to the nature of the determinant—virus, episome, or a result of some epigenetic mechanism—are considered in the discussion.

BIBLIOGRAPHIE

Ames (L. M.). — 1934. Hermaphroditism involving self-sterility and cross-fertility in the Ascomycete *Podospora anserina* (*Mycologia*, **25**, 43).

Arlett (C. F.). — 1957. Induction of cytoplasmic mutations in *Aspergillus nidulans* (*Nature*, **179**, 1250). — 1960. A system of cytoplasmic variation in *Aspergillus nidulans* (*Heredity*, **15**, 377).

Barton (A. A.). — 1950. Some aspects of cell division in *Saccharomyces cerevisiæ* (*Journ. of gen. Microbiol.*, **4**, 84).

Bartholomew (J. W.) et Tod Mittwer (T.). — 1953. Demonstration of yeasts bud scars with the electron microscope (*Journ. Bact.*, **65**, 272).

Beisson-Schecroun (J.). — 1962. Incompatibilité cellulaire et interaction nucléo-cytoplasmique dans les phénomènes de « barrage » chez le *Podospora anserina* (*Thèse Sciences, Paris*, et *Ann. Génétique, sous presse*).

Bernet (J.), Esser (K.), Marcou (D.) et Schecroun (J.). — 1960. Sur la structure génétique de l'espèce *Podospora anserina* et sur l'intérêt de cette structure pour certaines recherches de génétique (*C. R. Acad. Sc.*, **250**, 2053).

Bernet (J.). — 1962 *a*. Action de la température sur les modifications de l'incompatibilité cytoplasmique et les modalités de la compatibilité sexuelle entre certaines souches de *Podospora anserina* (*Ann. Sciences nat. Bot., sous presse*). — 1962 *b*. Sur les rapports entre le mode de fonctionnement des gènes et les modalités d'une auto-incompatibilité cytoplasmique chez le Champignon *Podospora anserina* (*C. R. Acad. Sc., sous presse*).

Bistis (G.). — 1956. Sexuality in *Ascobolus stercorarius*. I : Morphology of the Ascogonium, Plasmogeny, evidence for a sexual hormonal mechanism (*Amer. Jour. of Bot.*, **43**, 389).

Briault (P. G.). — 1956. Cytoplasmic changes associated with adaptation and differenciation (*Nature*, **178**, 1223).

Brun (G.). — 1962. Étude d'une association du virus σ et de son hôte la Drosophile : l'état stabilisé (*Thèse Sciences, Paris, sous presse*).

Cameron (J. W.) et Soost (R. K.). — 1952. Size, yield and fruit characters of orchard trees of *Citrus* propagated from young nucellar-seedling lines and parental old lines (*Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **60**, 255). — 1955. Tree size, yield and fruit characters in old lines and nucellar lines of *Citrus* (*Calif. Citrogr. U. S. A.*, **37**, 440).

Chevaugeon (J.). — 1959 *a*. La zonation du thalle, phénomène périodique autonome chez l'*Ascobolus immersus* (*C. R. Acad. Sc.*, **248**, 1381). — 1959 *b*. Sur le déterminisme interne du rythme de croissance chez un mutant « vague » de l'*Ascobolus immersus* (*C. R. Acad. Sc.*, **248**, 1841).

Chevaugeon (J.) et Lefort (C.). — 1960. Sur l'apparition régulière d'un « mutant » infectant chez un Champignon du genre *Pestalozzia* (*C. R. Acad. Sc.*, **250**, 2247).

Chevaugeon (J.) et Digbeu (S.). — 1960. Un second facteur cytoplasmique infectant chez le *Pestalozzia annulata* (*C. R. Acad. Sc.*, **251**, 3043).

Cohn (M.). — 1958. On the differenciation of a population of *Escherichia coli* with respect to β-galactosidase formation (in *The chemical basis of development*, ed. The John Hopkins Press, Baltimore, 458).

Cohn (M.) et Horibata (K.). — 1959. Analysis of the differenciation and of the heterogeneity within a population of *Escherichia Coli* undergoing induced β-galactosidase synthesis (*Jour. Bacteriol.*, **78**, 613).

Comfort (A.). — 1956. *The biology of senescence*, ed. Rinehart and Company, New York.

Cuzin (F.). — 1961. Apparition régulière chez *Curvularia pallescens* d'une variation sectorielle contagieuse, non transmissible par les thallospores (*C. R. Acad. Sc.*, **252**, 1656).

Danielli (J. F.). — 1959. Some theoretical aspects of nucleocytoplasmic relationships (*Exper. Cell. Res.*, sup. **6**, 252).

Day (P. R.). — 1959. A cytoplasmically controlled abnormality of the tetrads of *Coprinus lagopus* (*Heredity*, **13**, 81).

De Deken-Grenson (M.). — 1960. Le mécanisme de la perte héréditaire d'une fonction biochimique : la synthèse des chlorophylles (*Arch. Biol.*, **71**, 371).

De Fonbrune (P.). — 1949. *Techniques de micromanipulation*, Masson et C^ie^, édit., Paris.

Delbrück (M.). — 1949. Dans *Unités biologiques douées de continuité génétique* (Colloques internationaux du C. N. R. S., Paris, **7**, 33).

Dippell (R. V.). — 1955. Some cytological aspects of aging in variety 4 of *Paramecium aurelia* (*Jour. Protozool.*, sup. **2**, 7).

Doguet (G.). — 1955. Recherches sur la conservation des souches de Champignons en culture sur milieu nutritif gélosé (*Bull. Soc. Mycol. Fr.*, **71**, 135).

D'Oliviera (B.). — 1939. Studies on *Puccinia anomala*. I : Physiological races on cultivated barley (*Ann. Appl. Biol.*, **26**, 56).

Ephrussi (B.). — 1951. Remarks on cell Heredity (in *Genetics in the 20th Century*, ed. The Mac Millan Company, New York, 241).

Ephrussi (B.), Hottinguer (H.) et Chimenes (A. M.). — 1949. Action de l'acriflavine sur les Levures. I : La mutation « petite colonie » (*Ann. Inst. Pasteur*, **76**, 351).

Ephrussi (B.), Hottinguer (H.) et Tavlitzki (J.). — 1949. Action de l'acriflavine sur les Levures. II : Étude génétique du mutant « petite colonie » (*Ann. Inst. Pasteur*, **76**, 419).

Ephrussi (B.), Margerie-Hottinguer (H.) et Roman (H.). — 1954. Sur le comportement génétique des mutants à déficience respiratoire de la Levure (*VIII^e^ Congr. Intern. Bot. Paris, section 10*, 111). — 1955. Suppressiveness : a new factor in the genetic determinism of the synthesis of respiratory enzymes in yeast (*Proc. Nat. Acad. Sc.*, **41**, 1065).

Ephrussi (B.) et Slonimski (P.). — 1949. Transformation des populations de Levures sous l'action de l'acriflavine (*Rés. comm. I^er^ Congr. Intern. Biochimie, Cambridge*, 466).

Esser (K.). — 1954 *a*. Genetische Analyse eines neuen Incompatibilitätstypes bei dem Ascomyceten *Podospora anserina* (*VIII^e^ Congr. Intern. Bot. Paris, section 10*, 72). — 1954 *b*. Sur le déterminisme génétique d'un nouveau type d'incompatibilité chez *Podospora* (*C. R. Acad. Sc.*, **238**, 1731). — 1956. Die Incompatibilitätsbeziehungen zwischen geographischen Rassen von *Podospora anserina*. I : Die genetische Analyse der Semi-Incompatibilität (*Z. indukt. Abstamm. u. Vererb-Lehre*, **87**, 595). — 1959 *a*. Die Incompatibilitätsbeziehungen zwischen geographischen Rassen von *Podospora anserina*. II : Die Wirkungsweise der Semi-Incompatibilitätsgene (*Z. Vererb-Lehre*, **90**, 29). — 1959 *b*. Incompatibilitätsbeziehungen zwischen geographischen Rassen von *Podospora anserina*. III : Untersuchungen zur Genphysiologie der Barragebildung und Semi-Incompatibilität (*Z. Vererb-Lehre*, **90**, 445).

Frost (H. B.). — 1938. Nucellar embryony and juvenile characters in clonal varieties of *Citrus* (*Journ. of Heredity*, **29**, 423). — 1952. Characteristics in the nursery of *Citrus* buldings of young nucellar-seedling lines and parental old lines (*Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **60**, 247).

Frost (H. B.), Cameron (J. W.) et Soost (R. K.). — 1957. Diversity among nucellar-seedling lines of Satsuma Mandarin and differences from the parental old line (*Journ. Agric. Sc., Calif. Agric. Exp. Station*, **27**, 201).

Garnjobst (L.) et Wilson (J. W.). — 1956. Heterocaryosis and protoplasmic incompatibility in *Neurospora crassa* (*Proc. Nat. Acad. Sc. U. S.*, **42**, 613).

HAWKER (E. L.). — 1950. *Physiology in fungi*, ed. Univers. of London Press Warwick Square, London.

HOTCHKISS (R. D.). — 1958. Commentaires dans la discussion : « Molecular basis of the cause and expression of somatic cell variation » (*Journ. of Cell. and Compar. Physiol.*, **52**, 331).

JACOB (F.) et WOLLMAN (E.). — 1958. Les épisomes, éléments génétiques ajoutés (*C. R. Acad. Sc.*, **247**, 154).

JINKS (J. L.). — 1956. Naturally occuring cytoplasmic changes in fungi (*C. R. Lab. Carlsberg, ser. Physiol.*, **26**, 183). — 1957. Selection for cytoplasmic differences. (*Proc. Roy. Soc. Bot.*, **146**, 527). — 1958. Cytoplasmic differenciation in fungi (*Proc. Roy. Soc. Bot.*, **148**, 314). — 1959. Lethal Suppressive Cytoplasms in Aged Clones of *Aspergillus glaucus* (*Journ. gen. Microbiol.*, **21**, 397). — 1961. Colloque de Dallas, *sous presse*.

JOHNSON (T.). — 1946. Variation and the inheritance of certain characters in rust fungi (*Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **11**, 85).

L'HÉRITIER (Ph.). — 1958. The hereditary virus of *Drosophila* (*Adv. Virus Res.*, **5**, 195). — 1962 *a*. Les relations du virus héréditaire de la Drosophile avec son hôte (*Ann. Inst. Pasteur*, **102**, 511). — 1962 *b*. Le problème de l'hérédité non chromosomique (*Année Biol.*, **1**, 34).

LINDBERG (G. D.). — 1959. A transmissible Disease of *Helminthosporium victoriæ* (*Phytopathology*, **49**, 29).

MATHER (K.) et JINKS (J. L.). — 1958. Cytoplasm in sexual reproduction (*Nature*, **182**, 1188).

MAUPAS (E.). — 1883. Contribution à l'étude morphologique et anatomique des Infusoires ciliés (*Arch. Zool. exp. gen.*, supl. **2**, 1). — 1886. Recherches expérimentales sur la multiplication des Infusoires ciliés (*Arch. Zool. exp. gen.*, **6**, 116). — 1889. Le rajeunissement caryogamique chez les Ciliés (*Arch. Zool. exp. gen.*, **7**, 149).

MICHAELIS (P.). — 1954. Cytoplasmic inheritance in *Epilobium* and its theoretical significance (*Adv. in Gen.*, **6**, 287). — 1958. Untersuchungen zur Mutation Plasmatischer Erbträger, besonders der Plastiden (*Planta*, **51**, 600 et 722).

MITCHELL (M. B.) et MITCHELL (H. K.). — 1952. A case of maternal inheritance in *Neurospora crassa* (*Proc. Nat. Acad. Sc. U. S.*, **38**, 442).

MONNOT (F.). — 1953. Sur la possibilité de réaliser des croisements réciproques chez l'Ascomycète *Podospora anserina* (*C. R. Acad. Sc.*, **236**, 2263).

NGUYEN VAN (H.). — 1962. Rôle des facteurs internes et externes dans la manifestation de rythmes de croissance chez l'Ascomycète *Podospora anserina* (*C. R. Acad. Sc.*, **254**, 2646).

NOVICK (A.) et WIENER (M.). — 1957. Enzyme induction, an all or none phenomenon (*Proc. Nat. Acad. Sc. U. S.*, **43**, 553).

PITTENGER (T. H.). — 1956. Synergism of two cytoplasmically inherited mutants in *Neurospora crassa* (*Proc. Nat. Acad. Sc. U. S.*, **42**, 747).

RHOADES (M. M.). — 1949. Les Plastes dans *Unités biologiques douées de continuité génétique* (Colloques internationaux du C. N. R. S., Paris, **7**, 37).

RIZET (G.). — 1941. Les résultats d'ordre génétique et le problème de la sexualité chez l'Ascomycète *Podospora anserina* (*Rev. Mycol.*, **7**, 97). — 1942 *a*. Sur l'obtention d'irrégularités dans les asques et les spores de Pyrénomycètes du genre *Podospora* par l'action de quelques anesthésiques (*Bull. Soc. Lin. Normandie*, **2**, 123). — 1942 *b*. Sur l'hérédité d'un caractère de croissance et du pouvoir germinatif des spores dans une lignée de l'Ascomycète *Podospora anserina* (*Bull. Soc. lin. Normandie*, **2**, 131). — 1943. Recherches sur la génétique des Ascomycètes. Étude expérimentale de *Podospora anserina* (*Thèse Sciences, Paris*). — 1952. Les phénomènes de barrage chez *Podospora anserina*. I : Analyse génétique des barrages entre souches *S* et *s* (*Rev. Cyt. et Biol. vég.*, **13**, 51). — 1953 *a*. Sur l'impossibilité d'obtenir la multiplication végétative ininterrompue et illimitée de l'Ascomycète *Podospora anserina* (*C. R. Acad. Sc.*, **237**, 838). — 1953 *b*. Sur la longévité des souches de *Podospora anserina* (*C. R. Acad. Sc.*, **237**, 1106). — 1957. Les modifications qui conduisent

à la sénescence sont-elles de nature cytoplasmique ? (*C. R. Acad. Sc.*, **244**, 663).

Rizet (G.) et Engelmann (C.). — 1949. Contribution à l'étude génétique d'un Ascomycète tétrasporé : *Podospora anserina* (*Rev. Cyt. et Biol. vég.*, **11**, 201).

Rizet (G.) et Esser (K.). — 1953. Sur des phénomènes d'incompatibilité entre souches d'origines différentes chez *Podospora anserina* (*C. R. Acad. Sc.*, **237**, 760).

Rizet (G.) et Marcou (D.). — 1954. Longévité et sénescence chez *Podospora anserina* (*VIII*e *Congr. Intern. Bot.*, *section 10*, 121).

Ryan (F. J.), Beadle (G. W.) et Tatum (E. L.). — 1943. The tube method of measuring the growth rate of *Neurospora* (*Amer. Jour. of Bot.*, **30**, 784).

Sharpe (H. S.). — 1958. A dosed system of cytoplasmic variation in *Aspergillus glaucus* (*Proc. Roy. Soc., Ser. B. G. B.*, **148**, 355).

Schecroun (J.). — 1958. Sur la réversion provoquée des souches s^s en souches s chez *Podospora anserina* (*C. R. Acad. Sc.*, **246**, 1268). — 1959. Sur la nature de la différence cytoplasmique entre souches s et s^s de *Podospora anserina* (*C. R. Acad. Sc.*, **248**, 1394).

Sheng (T. C.). — 1951. A gene that causes natural Death in *Neurospora crassa* (*Genetics*, **36**, 199).

Schramm (C.). — 1958. Biosynthese des Tabakmosaikvirus (in *Biochemistry of viruses*, ed. Pergamon Press, 1).

Sonneborn (T. M.). — 1950. The cytoplasm in heredity (*Heredity*, **4**, 11). — 1954. The relation of Autogamie and Rejuvenescence in *Paramecium aurelia* (*Jour. Protozool.*, **1**, 38). — 1957. Aging in the *Paramecium aurelia-multimicronucleatum* complex (*Jour. Protozool.*, **4**, 21). — 1959. Kappa and related particles in *Paramecium* (*Adv. in Virus Res.*, **7**, 230).

Sonneborn (T. M.) et Craig (M. F.). — 1956. The Basis of Variation in Phenotype of gene-controlled Traits in Heterozygotes of *Paramecium aurelia* (*Jour. Protozool.*, sup. **3**, 8).

Sonneborn (T. M.) et Dippel (R.). — 1961 *a*. The modes of replication of cortical organisation in *Paramecium aurelia* syn. 4 (*Genetics*, **46**, 899). — 1961 *b*. Self-reproducing differences in the cortical organisation in *Paramecium aurelia* (*Genetics*, **46**, 900).

Sonneborn (T. M.) et Schneller (M.). — 1955 *a*. The basis of aging in variety 4 of *Paramecium aurelia* (*Jour. Protozool.*, sup. **2**, 6). — 1955 *b*. Genetic consequences of aging in variety 4 of *Paramecium aurelia* (*Genetics*, **40**, 596). — 1955 *c*. Are the cumulative effects of parental age transmissible trough sexual reproduction in variety 4 of *Paramecium aurelia* (*Jour. Protozool.*, sup. **2**).

Szilard (L.). — 1960. The control of the formation of specific proteins in bacteria and in animal cells (*Proc. Nat. Acad. Sc. U. S.*, **46**, 277).

Tavlitzki (J.). — 1954. Sur la croissance de *Podospora* en milieu synthétique (*C. R. Acad. Sc.*, **238**, 2341).

Vago (C.). — 1953. Virose aiguë à Polyèdres déclenchée par action du fluorure de sodium (*Experientia*, **9**, 466).

Weiss (P.). — 1958. Summation and elevation (in *The chemical basis of development*, ed. The John Hopkins Press, Baltimore, 843).

Wilson (J. F.), Garnjobst (L.) et Tatum (E. L.). — 1961. Heterocaryon incompatibility in *Neurospora crassa* : micro-injections studies (*Amer. Jour. of Bot.*, **48**, 299).

Yotsuyanagi (Y.). — 1955. Mitochondria and refractive Granules in the Yeast Cell (*Nature*, **176**, 1208).

PLANCHE I

CYCLE SEXUEL DU *PODOSPORA ANSERINA*

A. — Protopérithèces à la surface d'une culture sur moût de maïs gélosé.

B. — Hyphe conidiophore avec microconidies.

C. — Divers aspects possibles d'une confrontation entre souches autostériles. 1 : Confrontation entre souches de même signe ; 2 : Confrontation fertile normale ; 3 : Confrontation fertile entre souches formant un barrage.

D. — Résultats d'un croisement effectué par spermatisation. Les périthèces se forment dans les régions où l'on a déposé des gouttes d'une suspension de microconidies de signe convenable.

E. — Paquet d'asques tirés d'un même périthèce.

F. — Asques normaux tétrasporés et asques à cinq spores dont deux sont uninucléées.

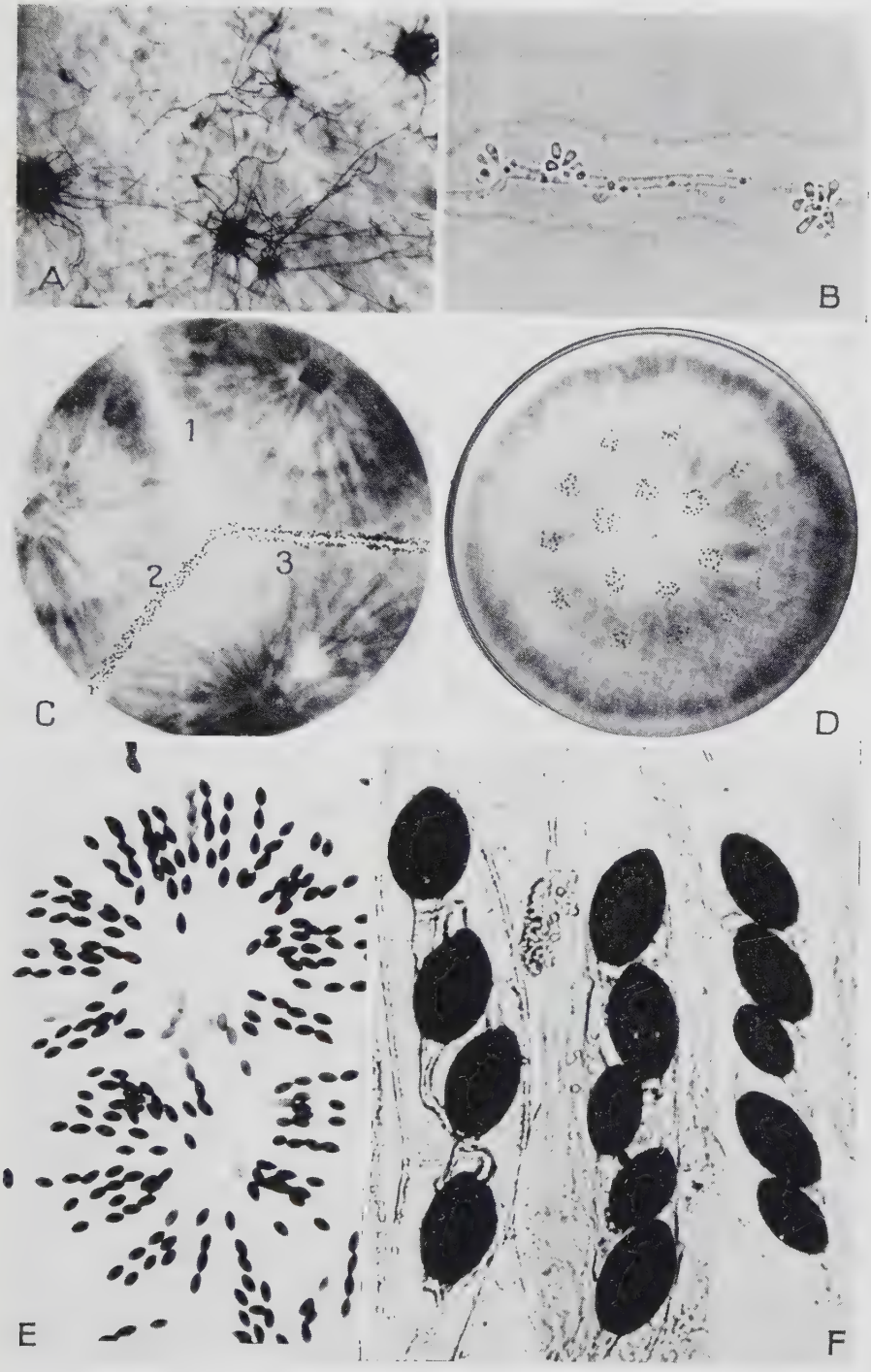

A
B
1
2
3
C
D
E
F

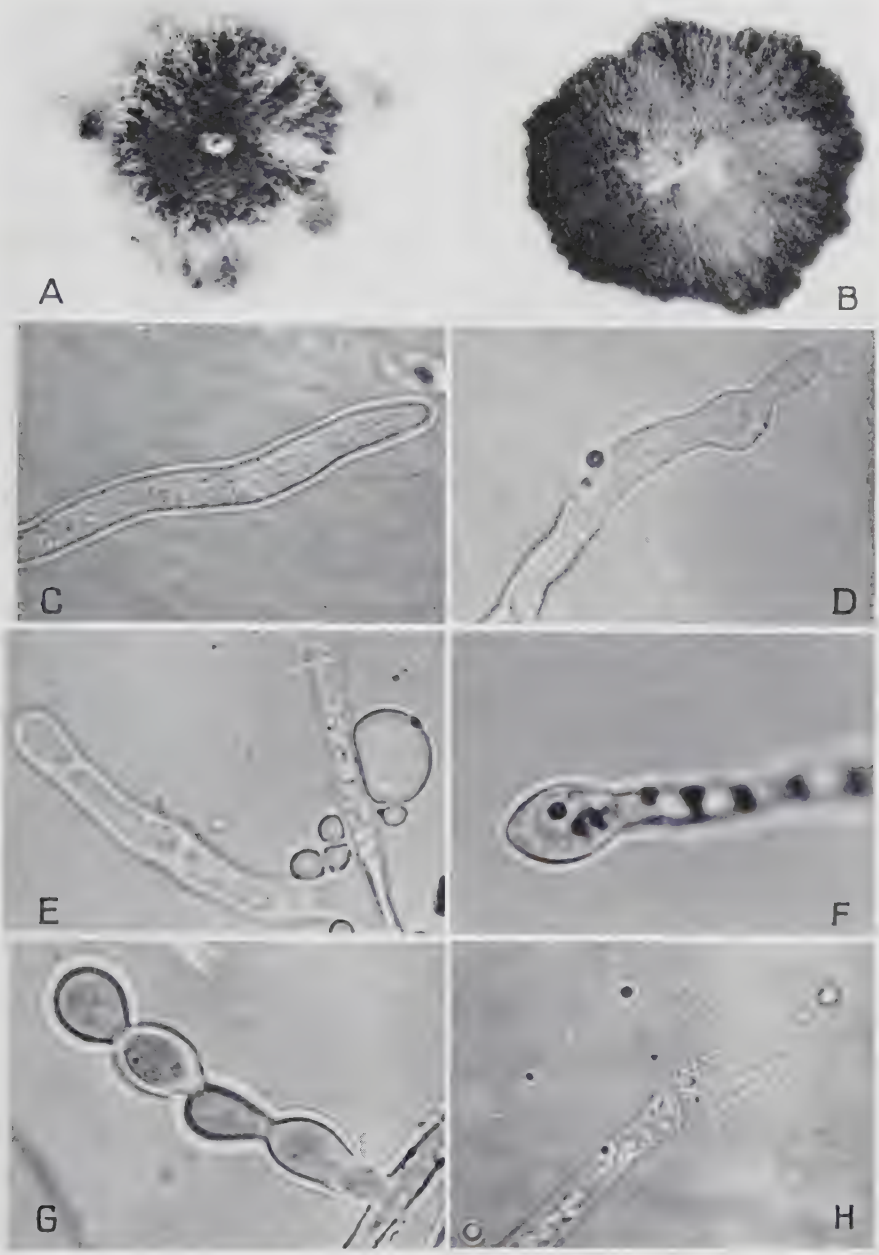
PLANCHE II

ASPECT GÉNÉRAL DES THALLES SÉNESCENTS ET MORPHOLOGIE COMPARÉE DES HYPHES NORMALES ET SÉNESCENTES

A et B. — Aspect général d'un thalle sénescent. (Dans l'image A, après l'arrêt global de croissance, pendant une période très limitée, quelques hyphes ont continué à croître et à se ramifier).

C. — Extrémité en croissance d'une hyphe normale.

D, E, F, G et H. — Divers aspects caractéristiques de filaments sénescents. D : irrégularité dans le diamètre des filaments ; E : présence de très grandes vacuoles aux extrémités de certaines hyphes; F : extrémité en forme de bulbes terminant un article qui contient de très gros granules; G : allure bourgeonnante de certains filaments ; H : éclatement et éjection du cytoplasme d'une extrémité d'hyphe.


A
B
C
D
E
F
G
H

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

« LES CHROMOSOMES EN GOUPILLON ET LES "PUFFS" DES CHROMOSOMES GÉANTS : LEUR INTÉRÊT POUR L'ÉTUDE DU MODE DE FONCTIONNEMENT DES GÈNES »

Vu et approuvé :

Orsay, le 29 Mai 1962.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Marc ZAMANSKY

Vu

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris.

Jean ROCHE